

The well-tempered Thrombin

A systematic crystallographic and calorimetric study on
the thermodynamics of serine-protease inhibition



Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bernhard Baum
aus Hameln

Marburg/Lahn 2009

Dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe in der Zeit von September 2005 bis April 2009 am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2009

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

A library of serine protease inhibitors to systematically study thermodynamic and structural properties of protein-ligand interactions

Applications of BioCalorimetry, Juli 2006, Zaragoza (Spanien), Poster selected for oral presentation

Binding affinity: More than the sum of its parts?

Summer School für Medizinische Chemie, September 2006, Regensburg, Poster

Understanding Structure-Activity Relationships: Thermodynamic and Crystallographic Studies of Thrombin Inhibitors

Frontiers in Medicinal Chemistry, Joint German-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry, März 2007, Berlin, Poster

Understanding Structure-Activity Relationships: Thermodynamic and Crystallographic Studies of Thrombin Inhibitors

Biophysics of ligand binding to drug targets, Mai 2007, Illkirch (Frankreich), Poster

Thermodynamic and crystallographic characterization of protein-ligand interactions

International Workshop "Merging Chemical & Biological Space", März 2007, Marburg, Poster

Understanding Structure-Activity Relationships: Thermodynamic and Crystallographic Studies of Thrombin Inhibitors,

Applications of BioCalorimetry, Juli 2007, Boston (USA), Poster

Aufsätze

Gerlach, C., Munzel, M., Baum, B., Gerber, H. D., Craan, T., Diederich, W. E. & Klebe, G. (2007).

KNOBLE: a knowledge-based approach for the design and synthesis of readily accessible small-molecule chemical probes to test protein binding. *Angew Chem Int Ed Engl* 46, 9105-9.

Baum B., Mohamed M., Zayed M., Gerlach C, Heine, A., Hangauer, D. and Klebe, G. (2009)

More than a simple lipophilic contact: A detailed thermodynamic analysis of nonbasic residues in the S1-pocket of Thrombin. *Journal of Molecular Biology*, 390, 56-69.

Baum B., Muley L., Heine, A., Hangauer, D. and Klebe, G. (2009)

Think twice: Understanding the high potency of bis-phenyl methane inhibitors of thrombin. *Journal of Molecular Biology*, 391, 552-64

Baum, B., Muley L., Smolinski M., Heine A., Klebe, G. and Hangauer, D. (2009)

Non-additivity of Functional Group Contributions in Protein-ligand Binding: A Comprehensive Study by Crystallography and Isothermal Titration Calorimetry.

Journal of Molecular Biology, submitted

Für meine Familie

Für melancholische Stunden:

Was ich lernen möchte

Es gibt so viele Dinge, von denen ein alter Mann einem erzählen müsste, solange man klein ist; denn wenn man erwachsen ist, wäre es selbstverständlich, sie zu kennen.

Da sind die Sternenhimmel, und ich weiß nicht, was die Menschen über sie schon erfahren haben, ja, nicht einmal die Anordnung der Sterne kenne ich.

Und so ist es mit den Blumen, mit den Tieren, mit den einfachsten Gesetzen, die da und dort wirksam sind und durch die Welt gehen mit ein paar Schritten von Anfang nach Ende.

Wie Leben entsteht, wie es wirkt in den geringen Wesen, wie es sich verzweigt und ausbreitet, wie Leben blüht, wie es trägt: alles das zu lernen, verlangt mich.

Durch Teilnahme an alledem mich fester an die Wirklichkeit zu binden, die mich so oft verleugnet, - dazusein, nicht nur dem Gefühle, sondern auch dem Wissen nach, immer und immer, das ist es, glaube ich, was ich brauche, um sicherer zu werden und weniger heimatlos.

Rainer Maria Rilke

Für den Rest:

Wer?Wie?Was? Wieso?Weshalb?Warum?

Wer nicht fragt, bleibt dumm.

Tausend tolle Sachen, die gibt es überall zu sehn.

Manchmal muss man fragen um sie zu verstehn.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	9
1.1	Wirkstoffdesign	9
1.2	Aufgabenstellung	13
1.3	Die Zielstruktur Thrombin	14
1.4	Die Inhibitorenserie UB_THR	16
1.5	Thermodynamik der Protein-Ligand Wechselwirkung	20
1.5.1	<i>Enthalpische Bindungsbeiträge</i>	<i>24</i>
1.5.2	<i>Entropische Bindungsbeiträge</i>	<i>25</i>
1.5.3	<i>Enthalpie-Entropie-Kompensation</i>	<i>27</i>
1.5.4	<i>Die Diskussion thermodynamischer Daten</i>	<i>30</i>
1.5.5	<i>Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)</i>	<i>31</i>
1.5.6	<i>Röntgenkristallographisch bestimmte B-Werte als Indikator für dynamische Parameter ..</i>	<i>37</i>
1.5.7	<i>Die Bedeutung thermodynamischer Daten für das strukturbasierte Wirkstoffdesign</i>	<i>39</i>
1.6	Thrombin als Zielmolekül für das Wirkstoffdesign	43
1.6.1	<i>Physiologische Grundlagen: Das System der Blutgerinnung [67]</i>	<i>43</i>
1.6.2	<i>Medikamentöse antithrombotische Therapie</i>	<i>47</i>
1.6.3	<i>Forschung nach neuen Antikoagulantien</i>	<i>51</i>
1.6.4	<i>Ausblick – in vivo veritas</i>	<i>56</i>
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	57
2.1	Der Thermodynamische Referenzzustand	57
2.2	Tabellarische Zusammenfassung aller gemessenen Daten	60
2.2.1	<i>Beurteilung der Datenqualität</i>	<i>66</i>
2.3	Diskussion von Enthalpie-Entropie-Kompensation	67
2.4	More than a simple lipophilic contact: A detailed thermodynamic analysis of nonbasic residues in the S1-pocket of Thrombin	69
2.5	Think twice: Understanding the high potency of bis-phenyl methane inhibitors of thrombin	82
2.6	Cooperativity in Ligand Binding	96
2.7	Untersuchungen zum Protonierungszustand der Inhibitoren	107

2.8	Kristallstrukturen weiterer Thrombin-Inhibitoren	110
2.8.1	<i>Der KNOBLE-Inhibitor MM18</i>	110
2.8.2	<i>Der duale Faktor Xa- und Thrombininhibitor MI-0002</i>	112
2.8.3	<i>Der Inhibitor MI-0008</i>	115
2.9	Isothermale Titrationskalorimetrie mit Ligandengemischen	117
3	SUMMARY AND PERSPECTIVE	123
4	EXPERIMENTAL PART	126
4.1	Kinetic Assay	126
4.2	Microcalorimetry (ITC).....	126
4.3	Crystallography	126
4.3.1	<i>Crystallographic table</i>	129
5	ANHANG.....	138
5.1	Abkürzungsverzeichnis	138
5.2	Kristallographische Begriffe.....	139
5.3	Literaturverzeichnis	141
5.4	Lebenslauf	141
5.5	Danksagung.....	152
5.6	Erklärung	153

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Wirkstoffdesign

Die Fortschritte der letzten Jahrzehnte auf allen Gebieten der medizinischen, biologischen und chemischen Forschung liefern uns ein immer präziseres Bild, welche pathobiologischen Mechanismen an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind. Selbst für komplexe Krankheitsbilder wie *Diabetes mellitus* oder Schizophrenien gelang es den Lebenswissenschaften, molekulare Angriffspunkte (*Targets*) zu identifizieren, von deren Beeinflussung durch Arzneistoffe Patienten profitieren. Viele dieser *Targets* sind Enzyme, die Stoffwechselprozesse beschleunigen oder als Rezeptoren der Informationsweiterleitung dienen. Die selektive Blockade einzelner zellulärer oder extrazellulärer humaner Proteine kann pathologische Stoffwechselzustände positiv beeinflussen oder bestimmte krankheitsverursachende Stoffwechselwege ausschalten. Im Falle von mikrobiologischen Erregern bedeutet die Inhibierung wichtiger Enzyme häufig die Hemmung ihrer Vermehrung, so dass diese *Targets* Angriffspunkt zur Entwicklung neuer Antinfektiva sind.

Während viele der klassischen Arzneistoffentdeckungen des letzten Jahrhunderts wie Aspirin®, Penicillin [1] oder *cis*-Platin [2] auf Zufallsbeobachtungen zurück gehen, ist es heute möglich, mit Hilfe des Wissens um die molekularen pathogenen Prozesse rational nach geeigneten Arzneistoffkandidaten zu suchen [3-5]. Dieser Ansatz verlangt eine ausgiebige Charakterisierung und Validierung des *Targets* sowie eine chemische Leitstruktur, deren Optimierung das Ziel der Arzneistoffentwicklung ist.

Zur Identifikation von Leitstrukturen werden verschiedene Wege verfolgt. Die Testung riesiger Substanzbibliotheken auf ihre inhibierende Wirkung (*Highthroughput Screening*, *HTS*) hat neben einer geringen Erfolgsrate unter 1 % den Nachteil hoher Kosten. Sind natürliche Inhibitoren oder Substrate des *Targets* bekannt, so kann versucht werden, diese zusammen mit Wissen über den Katalysemechanismus als potente niedermolekulare Inhibitoren zu optimieren. Eine weitere Möglichkeit ist das *de-novo design* von Leitstrukturen mit Hilfe von computergestützten Methoden. Das Verfahren des *virtual screening* [6] setzt idealerweise die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Zielproteins aus der Röntgenkristallographie [7, 8] oder aus NMR-Daten voraus.

Kann eine Kristallstruktur der Leitstruktur im Komplex mit dem Enzym gelöst werden, so sind die affinitätsbestimmenden Interaktionsmuster leicht zu identifizieren. Man nimmt dabei an, dass sich die beiden Moleküle in dieser als aktiv oder gebunden bezeichneten Konformation sowohl geometrisch als auch chemisch zueinander komplementär verhalten und dadurch die Bioaktivität bedingen. Nun kann das Inhibitormolekül strukturbasiert in Hinblick auf Affinität

und Selektivität optimiert werden - gewöhnlicherweise in einem zyklischen iterativen Prozess - bis die verlangten physikochemischen Eigenschaften erreicht sind.

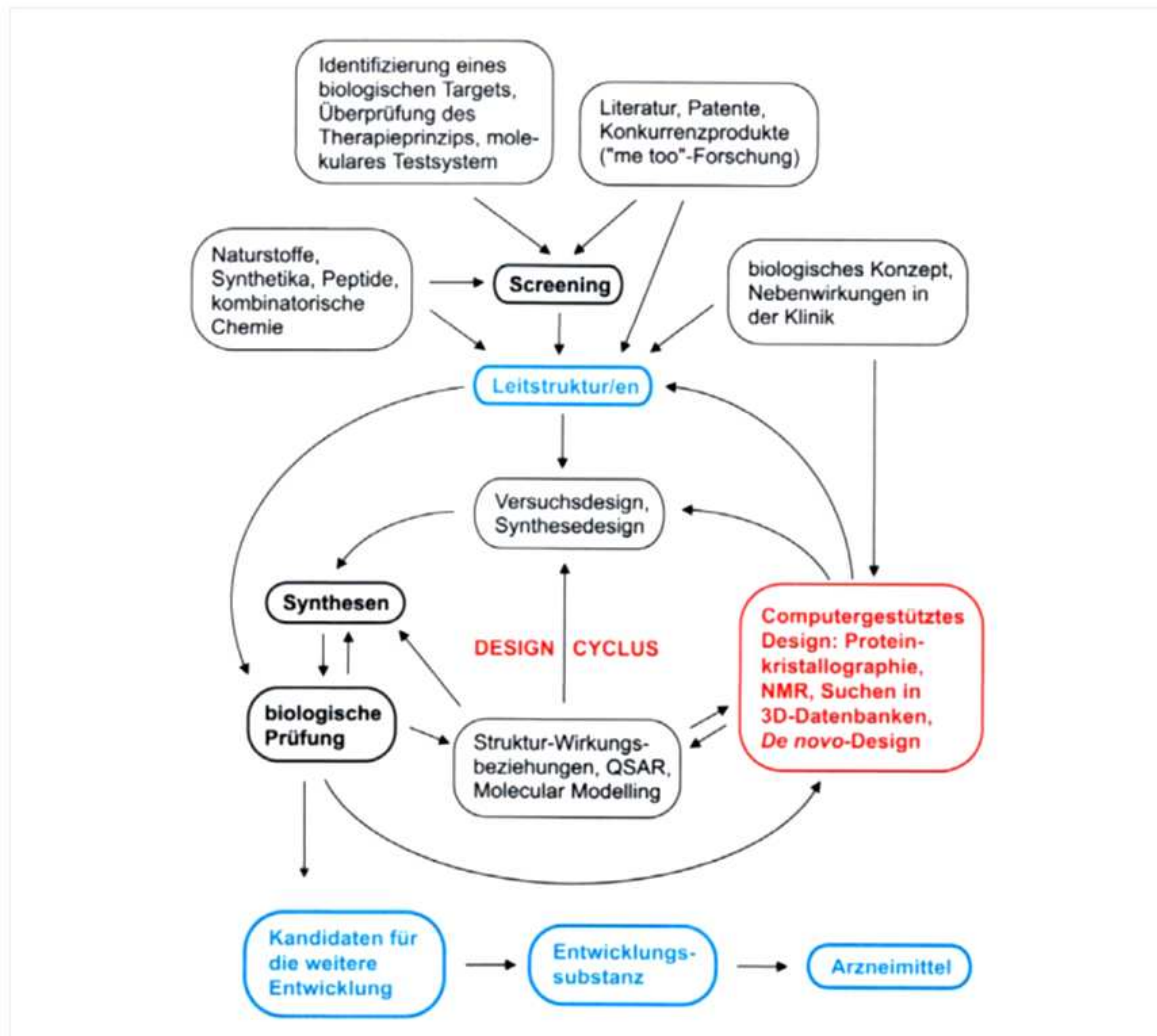


Abbildung 1 Designzyklus für die moderne rationelle Entwicklung von Arzneistoffen

Neben Affinität und Selektivität sind für die medizinische Anwendung die orale Bioverfügbarkeit, metabolische Stabilität und geringe Toxizität entscheidende Parameter. Diese rationale Strategie hat in den letzten Jahren einige wertvolle Arzneistoffe hervorgebracht (**Abbildung 2**).

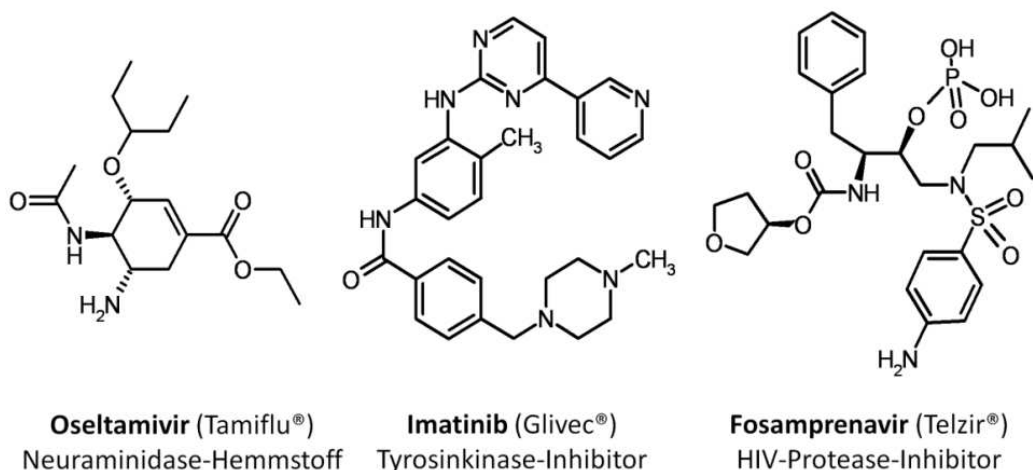


Abbildung 2 Beispiele für in wichtigen Indikationen zugelassene Arzneistoffe aus dem strukturbasierten Wirkstoffdesign

Die Zahl möglicher Zielproteine für zukünftige Entwicklungen ist enorm - bedenkt man, dass von den rund 22000 menschlichen Genen geschätzte 3000 Genprodukte als „*druggable*“, also durch Arzneistoffe beeinflussbar, eingeschätzt werden [9]. Die zunehmend auftretende Resistenz einiger viraler und bakterieller Krankheitserreger gegen gängige Antiinfektiva erfordert in naher Zukunft die Entwicklung neuer Substanzen. Dazu kann das strukturbasierte Wirkstoffdesign entscheidend beitragen, indem es die Relevanz einzelner Mutationen für die Bindung der Arzneistoffe „sichtbar“ macht. Es bleiben also zukünftige Aufgaben zur Erforschung neuer Arzneistoffe, die auf Erfolge der letzten Jahrzehnte aufbauen können sowie aus den Mißerfolgen lernen können. Entscheidend für eine schnelle und effiziente Entwicklung von niedermolekularen Enzymhemmstoffen ist dabei, die Suchstrategie auf eine solide Datenbasis zu stellen. Neben der statistischen Auswertung solcher Daten kann eine große Anzahl an verstandenen Beispielen dem medizinischen Chemiker die nötige Erfahrung vermitteln, um auch intuitiv zielführende Entscheidungen zu treffen.

Grundlage für die Suche nach Arzneistoffen *in silico* durch *virtual screening* ist neben der korrekten Vorhersage der Bindungsgeometrie die verlässliche Abschätzung der Bindungsaffinität durch *scoring*-Funktionen. Obwohl diese bereits an vielen *Targets* eindrucksvoll und erfolgreich genutzt wurden, sind sie noch weit von einer Standardanwendung entfernt [10]. Grund für die begrenzte Leistungsfähigkeit der *scoring*-Algorithmen ist vor allem die Tatsache, dass die Dynamik des Protein-Inhibitor-Systems schwer zu erfassen ist. Auch sind einige grundlegende affinitätsbestimmende Parameter unzureichend verstanden, wodurch die verwendeten Modelle als zu simpel eingeschätzt werden müssen [11]. Insbesondere ist problematisch, dass zur Vorhersage von Protein-Ligand-Wechselwirkungen häufig Ansätze verwendet werden, die auf Gruppenadditivitäten

basieren [12] oder auf der Additivität Freier-Enthalpie-Beiträge [13]. Dies macht die Methoden anfällig für Fehler und Varianz bei der Berechnung einzelner Komponenten. Eine strikte Betrachtung im Rahmen der statistischen Thermodynamik zeigt [14, 15], dass die Freie Energie (Freie Enthalpie) eine globale Eigenschaft eines betrachteten Systems und als solche vom gesamten Konfigurations- bzw. Phasenraum des Systems abhängt. Während es also möglich ist, in guter erster Näherung die Energie eines Systems in Einzelbeiträge zu separieren, gilt dies *prinzipiell* nicht für die Entropie [16] sowie die Freie Energie. Die Freie Energie ist zwar als Zustandsfunktion wegunabhängig, dies gilt jedoch nicht für ihre Komponenten [17], was Beispiele aus Mutationsstudien belegen [18-21]. Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel für Nichtadditivität -an anderer Stelle als Kooperativität [22] bezeichnet- ist der Nachweis, dass das Vergraben eines hydrophoben Molekülteils in einer molekularen Erkennungsstelle zur gleichzeitigen, kooperativen Verstärkung benachbarter elektrostatischer Wechselwirkungen führen kann [23, 24].

Bislang fehlen Studien, in denen die beschriebenen nichtadditiven Phänomene systematisch untersucht wurden. Um allgemeingültige Schlüsse zu treffen, aus denen optimierte *scoring*-Funktionen entwickelt werden können, bedarf es eines großen Datensatzes an Proteinliganden, die in gleicher Konformation an ein *Target* binden und deren Affinität durch systematisches Hinzufügen und Entfernen von Interaktionen variiert werden kann [25].

1.2 Aufgabenstellung

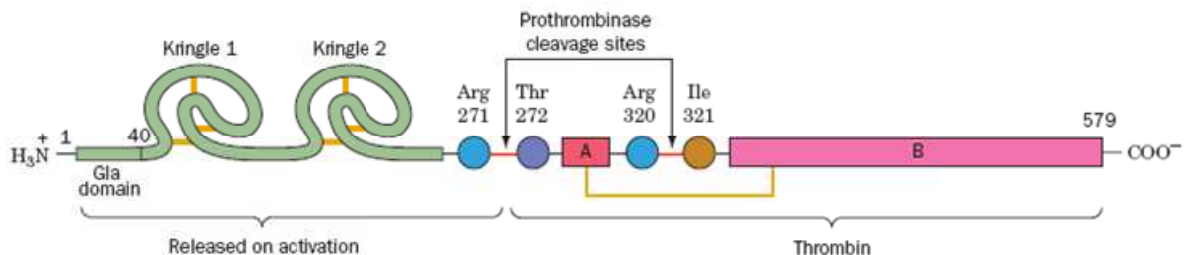
Ziel dieser Dissertation war es, anhand des Modellsystems Thrombin Untersuchungen zum tieferen Verständnis der Bindungsaffinität von kleinen Molekülen an ein Makromolekül durchzuführen und dabei besondere Aufmerksamkeit auf dynamische Aspekte zu richten. Mikrokalorimetrisch gewonnene thermodynamische Daten sollten für die kleinschrittig und systematisch variierte Inhibitorserie UB_THR (*Kapitel 1.4*) mit struktureller Information aus der Proteinkristallographie korreliert werden, um einen konsistenten Datensatz zur Erklärung einzelner Beiträge zur Bindungsaffinität zu gewinnen.

Folgende Fragestellungen sollten im Detail untersucht werden:

- Wie ist der inhibitorfreie Zustand des *Targets* als Referenzzustand für die thermodynamischen Überlegungen exakt zu beschreiben? Welches Bild ergibt sich für die Dynamik und Solvation des Proteins aus kristallographischer Sicht? (*Kapitel 2.1*)
- Wie beeinflussen sich einzelne Beiträge zur Bindungsaffinität gegenseitig? Gibt es kooperative Phänomene, und was sind hierfür mögliche Erklärungen? (*Kapitel 2.6*)
- Was sind die Gründe für die hohe Bindungsaffinität der neutralen *m*-Chloro-Benzylamide an das Zielenzym Thrombin? Beruht die starke Bindung auf einem lipophilen Kontakt [26] oder gibt es eine elektrostatische Komponente als attraktive Kraft? (*Kapitel 2.4*)
- Welche Rückschlüsse können aus den bei Verfeinerung des kristallographischen Modells berechneten *B*-Werten auf die Dynamik und die *residual entropy* der Inhibitoren im Komplex mit dem Zielenzym gezogen werden? (*Kapitel 2.4 und 2.6*)
- Welche treibende Kraft sorgt für die hohe Affinität der Biphenyl-methane an das *Target* Thrombin? Tragen beide Phenylringe auf gleiche Weise zur Affinität bei? (*Kapitel 2.5*)
- Wie beeinflussen pH-Wert des Lösungsmittels und die Wahl des Puffersystems die Bindung der Inhibitoren? Welche Rückschlüsse für das Verständnis der thermodynamischen Signatur sind daraus möglich? (*Kapitel 0*)

1.3 Die Zielstruktur Thrombin

Thrombin wird in der Leber als Prothrombin II exprimiert und erfährt anschließend eine Reihe post-translationaler Modifikationen, [27] bevor es ins Blutplasma gelangt. Die Spaltung von Prothrombin II wird durch Prothrombinase katalysiert, einem Komplex aus aktiviertem Faktor X und aktiviertem Faktor V, der sich in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen auf phospholipidhaltigen Oberflächen, z.B. den Thrombozyten, ausbildet. Es wird an Arg271 geschnitten und die N-terminalen Kringle-Domänen werden entfernt.



Durch eine zweite Spaltung an Arg 320 entsteht aktives Protein bestehend aus A- und B-Kette, das sich autokatalytisch an Position Arg285 spaltet. Durch die Abspaltung von 15 Aminosäuren der A-Kette wird die Aktivität nicht beeinflusst. Nun liegt die im Blutplasma aktive Form α -Thrombin vor, im übrigen Text nur als Thrombin bezeichnet. Thrombin spaltet verschiedene Substrate, darunter Fibrinogen, ein lösliches Plasmaprotein, das 2-3% des Proteinanteils im Plasma ausmacht. Die kristallographische Strukturbestimmung des aktiven Thrombins in Komplex mit Fibrinopeptid A liefert detaillierte Informationen zur Tertiärstruktur und zum Mechanismus der Substraterkennung [28] (**Abbildung 3**).

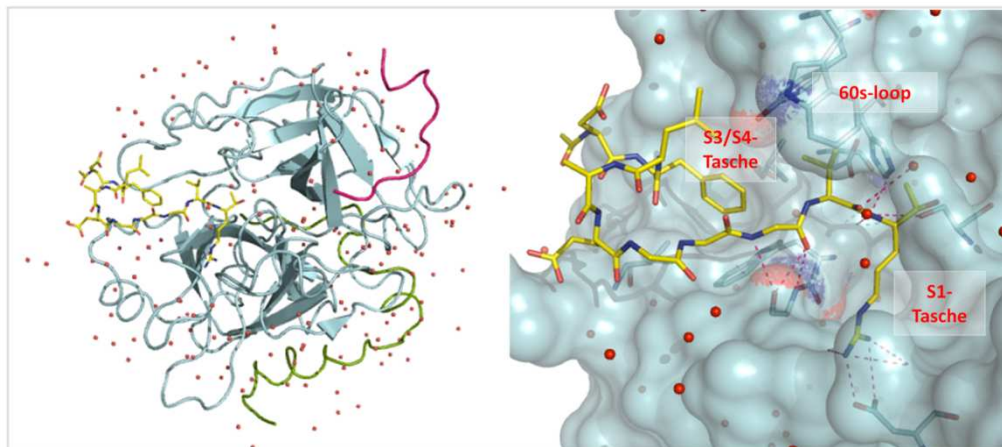


Abbildung 3 Kristallographische Ansicht von Thrombin [28] (schwere Kette hellblau, leichte Kette grün) mit gebundenem Fibrinopeptid A (gelb) und Wasser (rote Kugeln). *Links:* Übersicht der Tertiärstruktur mit Hirudinfragment in rosa. *Rechts:* Detailansicht auf die Active Site, wichtige H-Brücken sind als Linien in magenta angedeutet, die Proteinoberfläche ist in hellblau dargestellt

Die schwere Kette formt zwei sechssträngige antiparallele β -Faltblätter (β -*barrel*), die in einem *greek-key*-Motiv angeordnet sind (β 1-4), gefolgt von einer antiparallelen Haarnadelschleife (β 5/6). An der Grenze zwischen den beiden *barrels* im Schleifenbereich liegen die Reste der katalytischen Triade. In der Kristallstruktur ist ein synthetisches Fragment des Peptids Hirudin aus dem Blutegel *Hirudo Medicinalis* gebunden, dessen Bindung eine für das *soaking* geeignete Kristallpackung erzwingt.

Eine genaue Betrachtung der *Active Site* verdeutlicht, wie die selektive Erkennung des Substrates funktioniert und wie das Enzym für diesen Zweck optimiert ist. Während die basische Funktion des Arginins mit dem Aspartat am Boden der S1-Tasche einen idealen Wechsepartner findet, bedeckt der *60s-loop* das Valin an P2-Position wie ein Deckel. Insbesondere diese Wechselwirkung sorgt für die nötige Selektivität gegenüber anderen Substraten mit größeren Aminosäuren in P2. Die P3-Aminosäure Glycin bildet zwei Wasserstoffbrücken mit Glycin 216. Das Erkennungsmuster des Substrates ähnelt an dieser Stelle einem β -Faltblatt. Eine weitere charakteristische Wechselwirkung erfolgt durch den Kontakt eines Phenylalanyl-Restes in P9-Position mit der hydrophoben Tasche (S3/S4-Tasche).

1.4 Die Inhibitorenserie UB_THR

Zur systematischen Untersuchung der Beiträge einzelner Molekülfunktionen in Hinblick auf die Bindungsaffinität wurde im Arbeitskreis von Prof. David Hangauer an der University at Buffalo eine Serie von Thrombininhibitoren synthetisiert. Dabei wurde als Grundgerüst auf bekannte Inhibitoren zurückgegriffen, deren Bindungsmodus dem des natürlichen Substrats stark ähnelt. Die Wahl fiel auf Thrombin für die systematische Untersuchung der Bindungsaffinität aufgrund folgender Vorteile des Enzyms:

- Thrombin weist gut definierte Bindetaschen auf, von denen kaum Konformationsänderungen in Folge der Inhibitorbindung zu erwarten sind.
- Die Inhibitorbindung erfolgt unabhängig von Metallionen oder einem Kofaktor, dies ermöglicht eine vergleichsweise einfache Betrachtung.
- Die Inhibitorbindung in der *Active Site* wird in der Raumgruppe C2 nicht durch Kristallkontakte mit Symmetrieequivalenten Molekülen im Kristall beeinflusst, wodurch der kristallographisch beobachtete Bindungsmodus große Relevanz für den Zustand in Lösung hat.
- Es ist bereits eine Vielzahl von Inhibitoren bekannt, so dass Strategien zur Variation der Bindungsaffinität leicht zu entwickeln waren.
- Thrombin ist als *Target* in weiten Kreisen der medizinischen Chemie bekannt, daher kann das Modell von vielen Forschenden leicht verstanden werden.
- Die für mikrokalorimetrische Messungen benötigten großen Mengen an Thrombin standen durch eine großzügige Spende der Firma CLS Behring zur Verfügung.
- Die Methoden für den kinetischen *Assay*, die Kristallisation und die ITC sind im Arbeitskreis etabliert, so dass schnell gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden konnten.

Abbildung 4 zeigt als Beispiel UB_THR_32 [29] und schematisch seine wichtigsten Interaktionen mit dem Enzym. Der basische Benzamidinanker liegt unter physiologischen Bedingungen protoniert vor und bildet ähnlich dem Arginin des Fibrinogens eine doppelte Salzbrücke mit Aspartat 189 am Boden der S1-Tasche. Der zentrale Prolinbaustein ersetzt das Valin des natürlichen Substrates Fibrinogen und passt optimal unter Tyrosin 60A und Tryptophan 60D des *60s-loops*. Auf das Prolin folgt ein *D*-Phenylalanin-Rest, der am Eingang der S3/S4-Tasche zwei Wasserstoffbrücken zu Glycin 216 ausbilden kann, ähnlich der antiparallelen β -Faltblatt-artigen Interaktion des Fibrinogens mit Thrombin. Durch die ungewöhnliche Konfiguration des Phenylalanins zeigt der Phenylring direkt in Richtung der distalen hydrophoben Tasche (D-Pocket, S3/S4-Pocket). Somit wird diese, im Falle des natürlichen Substrates erst durch das Phenylalanin in P9 geformte, Interaktion schon mit einem niedermolekularen Stoff erreicht.

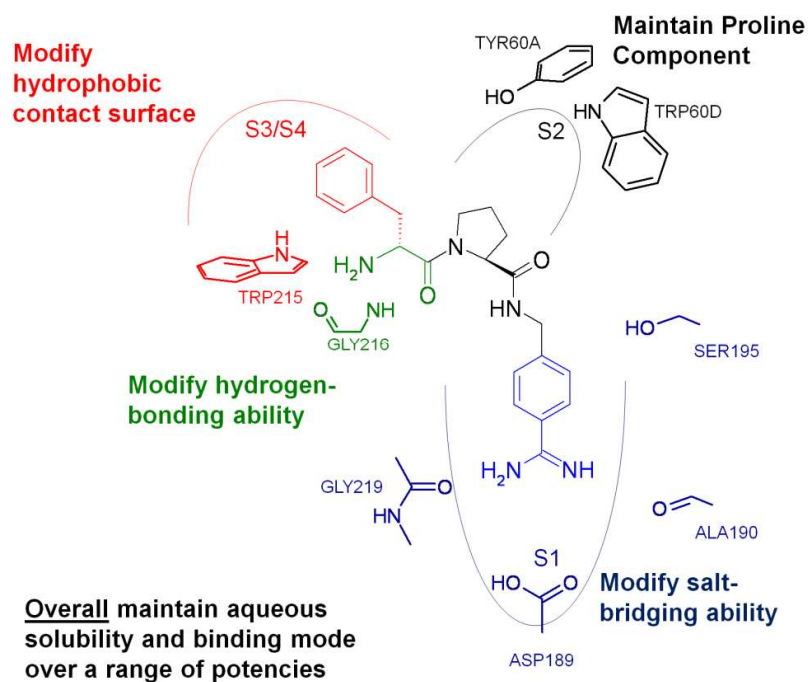


Abbildung 4 Designstrategie für die Inhibitorenserie UB_THR am Beispiel UB_THR_32

Ausgehend von dieser gut definierten Bindung werden in der Inhibitorenserie systematisch und kleinschrittig alle zur Affinität beitragenden Funktionalitäten variiert. Diese decken mit hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und einer Salzbrücke die wichtigsten attraktiven zwischenmolekularen Kräfte ab. Dabei geschieht die Bindung unabhängig von einem Kofaktor, auch Metallionen sind nicht an der Bindung beteiligt.

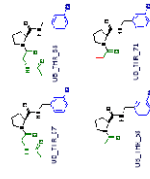
Weiteres Synthesziel war, neben der Erhaltung des Bindungsmodus über eine weite Spanne von Affinitäten, die Löslichkeit der Inhibitoren für die mikrokolorimetrischen Messungen und das *soaking* zur Kristallstrukturbestimmung zu gewährleisten. Dieses Ziel konnte leider nicht für die gesamte Serie erreicht werden, da die Hydrophilie und damit die Löslichkeit in Wasser mit der Entfernung von polaren Molekülteilen, wie der primären Aminofunktion und dem Benzamidinanker, deutlich zurückging. Daher mußten für den kinetischen Assay, bei der ITC und für die Kristallstrukturbestimmung standardisierte Anteile des Kosolvens Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet werden, um eine ausreichende Löslichkeit der Hemmstoffe zu gewährleisten.

Abbildung 5 zeigt die Strukturformeln der gesamten Serie UB_THR sortiert nach der Nummerierung, die aus der Reihenfolge der Synthese entstanden ist.

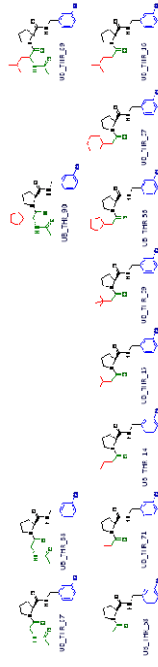
Die als Poster beiliegende Abbildung zeigt die Inhibitoren in einer Anordnung, in der die Systematik der Synthesestrategie zu erkennen ist. Der Hauptteil der Serie variiert

verschiedene lipophile Reste zur Unterbringung in der S3/S4-Tasche, jeweils für zwei verschiedene Verankerungen in der S1-Tasche (Benzamidin oder *m*-Chloro-Benzyl) und jeweils mit und ohne primäre Aminofunktion zur Bindung an Gly 216. Einige Inhibitoren weisen eine *N*-Acetylierung an dieser Aminogruppe auf. Für die Cyclohexyl- und Cyclopentylderivate stehen zusätzlich die Inhibitoren mit einem sekundären Amin oder mit Etherfunktion zur Verfügung. 26 der Inhibitoren unterscheiden sich nur in dem Teil, der in die S1-Tasche bindet.

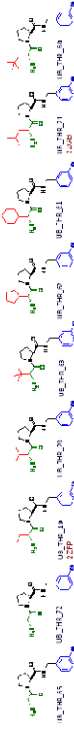
m-Chlorobenzyls
+ sec. Amine



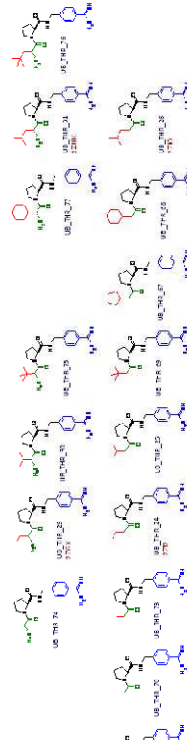
m-Chlorobenzyls



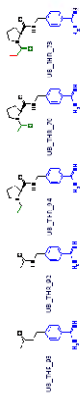
m-Chlorobenzyls
+ prim. Amine



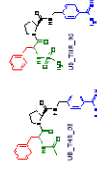
Benzamides
+ prim. Amine



Benzamides



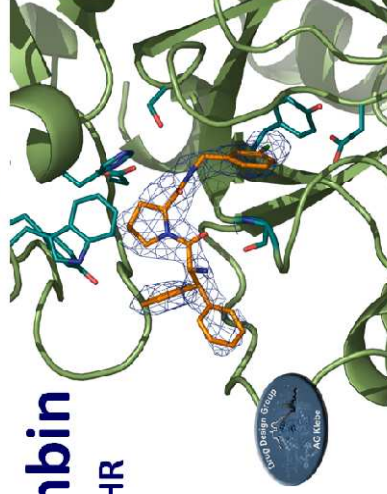
Benzamides
+ sec. (Sulfon)-Amide



Targeting Thrombin

Inhibitor-Series UB_THR

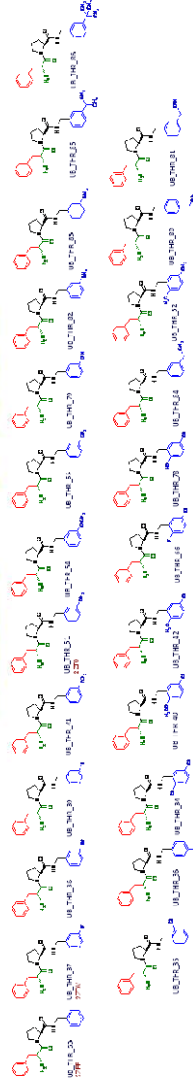
PDB-Code in red
apo-Thrombin 3D49

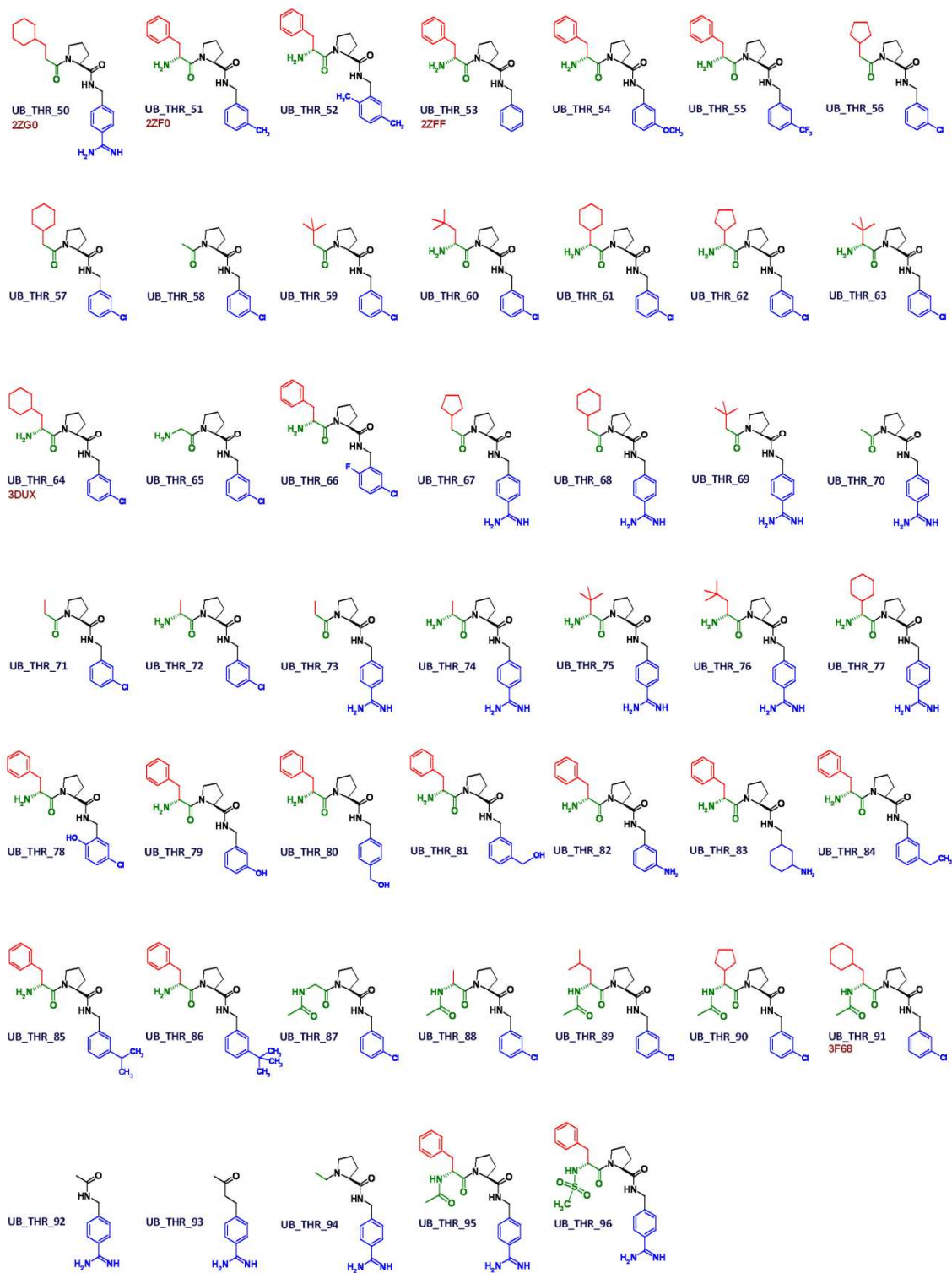


Philipps
Universität
Marburg

UB University at Buffalo
The State University of New York

S1-Variations





1.5 Thermodynamik der Protein-Ligand Wechselwirkung

Biologische Prozesse basieren meist auf der hochspezifischen Erkennung zwischen Molekülen, das Funktionieren eines Organismus hängt von der fein regulierten Affinität zwischen bestimmten Bindungspartnern ab. Eine selektive und effektive Erkennung einzelner Moleküle findet in allen Kompartimenten und Zuständen eines lebenden Organismus statt und bildet die Grundlage der biochemischen Vorgänge, die die Entstehung und Vermehrung von Leben ermöglichen. Trotz der universellen Natur dieser zwischenmolekularen Kräfte ist das Wissen um die molekularen Grundlagen der zwischenmolekularen Kräfte bisher begrenzt. So ist die Vorhersage von Bindungsaffinitäten selbst bei bekannter räumlicher Struktur eines gebildeten bimolekularen Komplexes immer noch alles andere als ein trivialer Prozess. Das „strukturbasierte Design“ von Proteinliganden ist daher trotz vorhandener Erfolge noch weit entfernt von einem routinemäßig anwendbaren Rezept zur Entdeckung von Arzneistoffkandidaten.

Die Basis für das Wirkstoffdesign bildet daher das grundlegende Verständnis, wie mit Hilfe von kleinen Molekülen in Stoffwechselprozesse eingegriffen werden kann und welche molekularen Eigenschaften die Bindung von Arzneistoffen an Zielproteine beeinflussen. Der Prozess der Bindung von kleinen Molekülen an Proteine ist ein interessanter Aspekt des Themas „molekulare Erkennung“ (*molecular recognition*), der sich mit der Fragestellung beschäftigt, welche Faktoren auf atomarer Ebene die Wechselwirkung von Biomolekülen mit ihren verschiedensten Bindungspartnern bestimmen. Das tiefe Verständnis der attraktiven Kräfte zwischen Molekülen ist Grundlage für jede Art von *Molecular Modelling*.

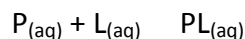
Molekülliganden können kleine organische Moleküle oder große Biomoleküle wie DNA, RNA, Oligosaccharide, Zucker oder Peptide sein. Die Bindung eines, meist im Molekulargewicht um Größenordnungen kleineren, Liganden an ein Protein kann enorme Auswirkungen auf die Struktur und Aktivität des Makromoleküls haben. Beispiele hierfür sind die allosterische Aktivierung von Proteinen durch Ionen und kleine organische Moleküle, oder die für diese Arbeit interessanten Wechselwirkungen kleiner organischer Liganden mit Enzymen, die durch Ligandenbindung inhibiert werden. Aber auch natürliche Substrate bilden analoge zwischenmolekularen Kräfte zum Protein aus, ebenso kann DNA als Ligand eines Proteins vorkommen, zum Beispiel bei Transkriptionsfaktoren.

Strukturbiologische Methoden wie Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie liefern ein präzises aber meist statisches Bild, *wie* Moleküle interagieren. Um Antworten auf die Frage zu finden, *warum* das so ist, bedarf es weiterer Methoden, die die Betrachtung *aller* thermodynamisch relevanten Veränderungen während des Bindungsprozesses ermöglichen.

Die begrenzte Fähigkeit zur Vorhersage von Bindungsaffinität aus struktureller Information ergibt sich vor allem aus der Komplexität des Problems [10, 11]. Die verschiedenen Einzelbeiträge zur Affinität können deutlich größere Ausmaße haben als ihre Summe, wobei

sich einzelne Einflüsse aufaddieren oder ausbalancieren können. Bindungsaffinität wird zudem stark durch dynamische Effekte bestimmt. Die Stärke der Bindung eines Proteinliganden hängt nicht nur von der räumlichen Anordnung der einzelnen Atome ab, sondern auch von ihrer Dynamik - also wie stark ihre Position im Raum sich in Abhängigkeit von der Zeit ändert. Das Problem verkompliziert sich weiter durch die Tatsache, dass zum exakten Verständnis der treibenden Kräfte nicht nur Informationen über Struktur und Dynamik von Protein und Ligand nötig sind, sondern auch über das umgebende Lösungsmittel Wasser, welches dramatischen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben kann.

Eine Protein-Ligand Wechselwirkung ist im Falle von nichtkovalenter Bindung ein klassisches chemisches Gleichgewicht und wird durch thermodynamische Parameter charakterisiert.



Die Bindung eines Liganden an ein Protein ist dann ein spontaner Prozess, wenn die freie Gibbs Energie ΔG_{bind}^0 zur Bildung des Protein-Inhibitor Komplexes negativ ist. Dabei ist nicht nur die reine intermolekulare Protein-Inhibitor Wechselwirkung zu betrachten, sondern auch Änderungen der intra- sowie weiterer intermolekularer Wechselwirkungen. Letztere beziehen sich hauptsächlich auf Wassermoleküle, welche Protein und Ligand im ungebundenen Zustand vollständig umgeben und daher auf keinen Fall vernachlässigt werden dürfen. Es kann zwischen fest gebundenen und lose assoziierten Wassermolekülen unterschieden werden.

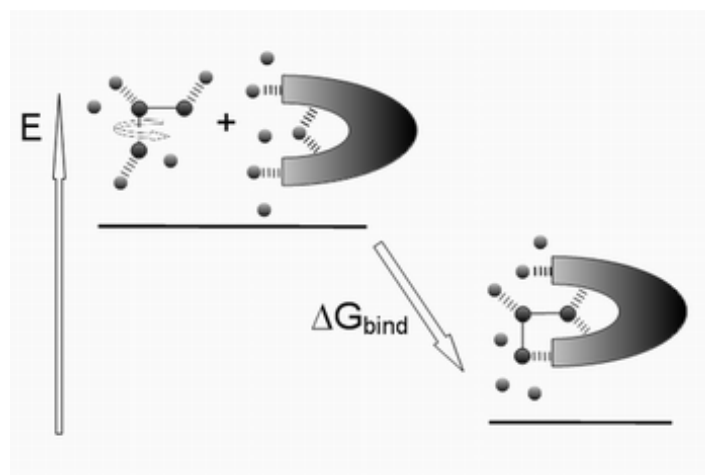


Abbildung 6 Schematische Darstellung einer Protein - Ligand Wechselwirkung. Wassermoleküle sind als kleine Kugeln dargestellt.

ΔG_{bind}^0 reflektiert die Summe aller Zustandsänderungen, die während der Bindung unter Standardbedingungen auftreten und gibt daher die Affinität des Liganden zum Protein im Gleichgewicht an, die sich in der Bindungskonstante K_a ausdrückt. (Gleichung 1).

$$\Delta G_{bind}^0 = -RT \ln K_a \quad (1)$$

R ist die allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) und T die absolute Temperatur in K. Die freie Gibbs Energie ΔG^0 setzt sich (nach Gleichung 2) aus einem enthalpischen (ΔH^0) und einem entropischen Beitrag $T\Delta S^0$ zusammen.

$$\Delta G^0_{\text{bind}} = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (2)$$

1.5.1 Enthalpische Bindungsbeiträge

Die Enthalpieänderung ΔH^0 stellt die energetische Summe aller während der Protein-Ligand Bindung neu geformten, aufgebrochenen oder in ihrer Stärke veränderten Wechselwirkungen innerhalb des Proteins, des Liganden und zwischen beiden untereinander oder zum Lösungsmittel dar. Dabei handelt es sich meist nicht um kovalente Bindungen, sondern hauptsächlich um Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen. Die absolute Stärke einer Wasserstoffbrückenbindung kann zwischen 12 und 40 kJ/mol betragen [30] und liegt damit direkt im Bereich einer Protein-Ligand-Wechselwirkung, die meist mehrere Wasserstoffbrücken aufweist. Dies ist kein Widerspruch, da im Falle noch nicht miteinander in Wechselwirkung stehender Proteine und Liganden normalerweise alle Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren durch Wassermoleküle abgesättigt werden, so dass zur Bindungsenthalpie nur die relative Änderungen der Stärke dieser Wasserstoffbrücken beitragen. Eine zusätzliche oder verlorene Wasserstoffbrücke durch die Komplexbildung ändert den Betrag von ΔH^0 aber erheblich.

Eine enthalpisch besonders günstige Wechselwirkung wird durch Salzbrücken zwischen geladenen Molekülteilen ausgebildet. Diese elektrostatische Attraktion ist stark vom Protonierungszustand der Interaktionspartner abhängig, welcher sich wiederum durch lokale Änderung der Dielektrizitätskonstante in der Bindetasche während des Bindungsprozesses ändern kann. Dieser „*induced dielectric fit*“ kann die dielektrischen Eigenschaften an der Grenzfläche der interagierenden Moleküle so stark verändern, dass der pK_a -Wert von Carboxylatgruppen um mehr als vier Einheiten verschoben wird [31].

Weitere gerichtete, aber schwache elektrostatisch günstige Wechselwirkungen sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen $\text{C-H} \cdots \text{O-}$, $\text{C-H} \cdots \text{N-}$, $\text{C-H} \cdots \pi$ -Systemen und $\text{C-H} \cdots \text{Cl}$ [32, 33]. Zusätzlich können sich zwischen aromatischen Gruppen des Liganden und aromatischen Aminosäuren auf Seiten des Rezeptormoleküls enthalpisch günstige π - π -Wechselwirkungen ausbilden [34, 35]. Weitere wesentliche Beiträge zur Bindungsaffinität können *cation- π interactions* liefern, also Wechselwirkungen zwischen Kationen wie Tetraalkylammoniumionen und aromatischen Systemen [36].

Ein Hauptgrund für ein enthalpisch ungünstiges Bindungsprofil ist oft das „Vergraben“ von polaren Gruppen, für die der hohe Preis der Desolvatationsenergie nicht durch neu geformte Wasserstoffbrücken ausbalanciert werden kann.

1.5.2 Entropische Bindungsbeiträge

Die entropischen Beiträge zur Bindung stellen die Änderung der Zahl der verfügbaren Zustände des Systems dar, die während einer Gleichgewichtsreaktion für ein abgeschlossenes System nicht abnehmen dürfen. Änderungen in den Ordnungszuständen der Lösungsmittelmoleküle, besonders an hydrophoben Grenzflächen, sowie Änderungen in Freiheitsgraden der Moleküle bezüglich ihrer Rotation, Translation und Vibration stellen die Hauptbeiträge zur Entropie dar.

Ein frei im Lösemittel beweglicher Ligand verliert meist interne Rotationsfreiheitsgrade durch die Bindung an ein Protein. Daher gilt, je starrer ein freier Ligand ist, desto weniger negativ ist der entropische Beitrag verursacht durch Einschränkung der Rotation ($\sim 1,4$ kJ/mol pro Bindung [37]). Bei der Betrachtung der Entropieänderung für den Liganden muss bedacht werden, dass nicht nur interne Freiheitsgrade verloren gehen (*conformational entropy*), sondern auch eine Reduktion von Translations- und Rotationsentropie auftritt (*configurational entropy*). Verliert ein kleiner Ligand durch die Bindung an das Protein sämtliche Freiheitsgrade für Translation und Rotation, so beträgt die „*entropic penalty*“ theoretisch ungefähr 57 kJ/mol [17]. Experimentelle Schätzungen auf der Basis des *multi-valency*-Phänomens ergeben einen Wert von ungefähr 25 kJ/mol [38]. Dies lässt vermuten, dass dem Liganden tatsächliche Freiheitsgrade bleiben, deren Beitrag häufig *residual entropy* genannt wird.

Die Änderung der Entropie durch den Bindungsprozess hängt nicht nur von der Dynamik, also der Anzahl erlaubter Mikrozustände des Komplexes ab, sondern auch von der Dynamik der Bindungspartner vor der Assoziation. Daher ließe sich intuitiv eine negative Änderung der Gesamtentropie vermuten, da sowohl Protein als auch Ligand durch die Bindung weniger dynamisch sein sollten. Mit Hilfe von Methoden der NMR-Relaxation konnte jedoch nachgewiesen werden, dass bei der Bindung hydrophober Moleküle an ein Protein die Seitenketten der Aminosäuren in der Bindetasche zwar in ihren Freiheitsgraden eingeschränkt sind, einige Aminosäuren in größerer Entfernung von der Bindetasche aber eine höhere Dynamik aufweisen [39]. In dieser Studie resultierte eine durch das Protein verursachte Änderung der Entropie von nahezu Null, woraus geschlossen werden kann, dass die beobachteten Effekte sich gegenseitig kompensieren. Grundsätzlich ist aber eine Zustandsänderung des Proteins bedingt durch die Ligandenbindung immer zu berücksichtigen, da viele Proteine eine gewisse Adaption an den Liganden bis hin zu Konformationsänderungen aufweisen. Die Rotationsfreiheitsgrade von Proteinseitenketten werden meist zur Vereinfachung der Affinitätsvorhersage vernachlässigt, da zum einen eine Betrachtung sehr aufwändig ist und zum anderen das Protein als Zielobjekt des rationalen Wirkstoffdesigns als gegeben angesehen wird. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz des relativen Vergleichs innerhalb einer Ligandenserie ist die Vernachlässigung der

Proteinfreiheitsgrade in den meisten Fällen legitim, da die Effekte in allen Komplexen analog auftreten.

Hydrophobe Effekte treten dann auf, wenn hydrophobe Oberflächen „vergraben“ werden. Daraus resultiert nach klassischer Vorstellung eine Neuorganisation des umgebenden Lösungsmittels [40]. Da Wassermoleküle keine Wasserstoffbrücken zu apolaren Oberflächen ausbilden können, kommt es an diesen Oberflächen zu einer Zerstörung des Wasserstoffbrückennetzwerkes in der reinen Wasserphase, dem sogenannten *bulk*-Wasser. Wassermoleküle an diesen Grenzflächen mit dem gelösten Molekül bilden daher *weniger* Wasserstoffbrücken - diese sind jedoch *stärker*, woraus ein größerer Ordnungszustand resultiert. Dieser Ordnungsprozess an hydrophoben Oberflächen wurde auf verschiedene Weise als „icebergs“, „clathrates“ oder „flickering clusters“ beschrieben [40-42]. Neuere theoretische Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass Wassermoleküle sich von hydrophoben Oberflächen weg bewegen um eine Grenzfläche zu bilden, die der Grenze zwischen Wasser und Wasserdampf ähnelt [43]. Die Standardentropie für die Solvation, also für die Überführung von der Gasphase in Wasser, ist grundsätzlich negativ. Daher ist die Assoziation von zwei hydrophoben Molekülteilen in wässriger Lösung grundsätzlich immer ein Prozess mit einem für die Bindung vorteilhaften entropischen Beitrag. Hydrophobe Wechselwirkungen wurden daher lange als grundsätzlich entropiegetrieben charakterisiert. Trotzdem wurden immer wieder auch für hydrophobe Interaktionen enthalpiegetriebene thermodynamische Signaturen beobachtet [44-46]. Daher wird derzeit diskutiert, ob davon ausgegangen werden muss, dass hydrophobe Bindetaschen in Abhängigkeit von ihrer Form als „*suboptimal hydrated*“ betrachtet werden müssen [47, 48]. Dieses Konzept von Bindetaschen mit der Eigenschaft „*poorly solvated*“ wurde für das *mouse major urinary protein* (MUP) mit Hilfe von Moleküldynamiksimulationen nachgewiesen [45, 46] und auch für das COX-2 Enzym beobachtet [48]. Dieses Modell einer nur zeitweise mit Wasser gefüllten hydrophoben Bindetasche bleibt jedoch die Antwort schuldig, was sich in der verbleibenden Zeit darin befindet - gegen ein „Vakuum“ sprechen grundsätzliche thermodynamische Überlegungen.

Eine weitere Größe, die mit hydrophoben Wechselwirkungen in Relation steht, ist eine negative Änderung der Wärmekapazität (bei konstantem Druck) ΔC_p . Auch wenn bisher keine zufriedenstellende quantitative Beziehung festgestellt werden konnte, hängt dieser Effekt deutlich von der Größe der „vergrabenen“ hydrophoben Flächen ab. Das Phänomen ist durch die beschriebene Solvensreorganisation erklärbar. Die in einem hohen Ordnungszustand vorliegenden Wassermoleküle an den hydrophoben Oberflächen besitzen die Fähigkeit, mehr thermische Energie ohne gleichzeitige Temperaturerhöhung aufzunehmen, da sie weniger kinetische Energie aufweisen als bei gleicher Temperatur in der *bulk-water*-Phase. Im Umkehrschluß führt der Verlust dieser geordneten Wassermoleküle durch hydrophobe Bindung zu einer negativen Änderung der Wärmekapazität.

Eine schwer abzuschätzende Größe ist die Entropieänderung, die durch Desolvatation von Ligand und Protein entsteht. Für hydrophobe Oberflächen wurde dies bereits als entropisch günstig beschrieben, aber auch polare oder geladene Molekülteile müssen zur Ausbildung optimaler Wechselwirkungen desolvatisiert werden. Es ist anzunehmen, dass auch dieser Prozess entropisch günstig ist, eine Möglichkeit zur Quantifizierung gibt es bis heute nicht. Lediglich für einige hydrophobe, aus Lösung leicht flüchtige Moleküle, gelang durch *vapour-water* Verteilungsexperimente eine Bestimmung der Solvationsentropie von ungefähr 27 kJ/mol für $T\Delta S$ [49]. Da diese jedoch aus wenigen Datenpunkten mit nur Zweifachbestimmung für die Temperaturabhängigkeit der Standardsolvationsenergie gewonnen wurde, kann man hier nur von einer ungenauen Schätzung sprechen. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass viele Proteinliganden nur teilweise desolvatisiert werden und Wassermoleküle als Verbrückung zwischen polaren Gruppen von Inhibitor und Rezeptor dienen können.

1.5.3 Enthalpie-Entropie-Kompensation

Charakteristisch für die Protein-Ligand-Wechselwirkung ist der Effekt der Enthalpie-Entropie-Kompensation [50], auch wenn theoretische Berechnungen für Gasphasenreaktionen dies nicht als allgemeingültig beweisen [51]. Dabei handelt es sich um eine Verschiebung der jeweiligen energetischen Beiträge verschiedener Liganden bei unveränderter Gesamtaffinität. Dieses Ausbalancieren ist darauf zurückzuführen, dass die Energie schwacher intermolekularer Wechselwirkungen mit der thermischen Energie bei Raumtemperatur vergleichbar ist [37]. Ein stark enthalpisch bindender Ligand ist durch die festen Wasserstoffbrückenbindungen in seiner Bewegung stark eingeschränkt, so dass der entropische Beitrag zur Affinität geringer wird. Andererseits ist ein schwächer enthalpisch bindender Ligand durch weniger gerichtete Wechselwirkungen nicht so stark in seiner

verbleibenden Dynamik (*residual motion*) eingeschränkt, was in einem größeren entropischen Anteil zur Bindungsaffinität resultiert. Diese Betrachtungen gelten nicht für kovalente Bindungen, die zwischen Protein und Ligand ausgebildet werden, da hier die freie Enthalpie der Bindung im Allgemeinen um einige Größenordnungen größer ist.

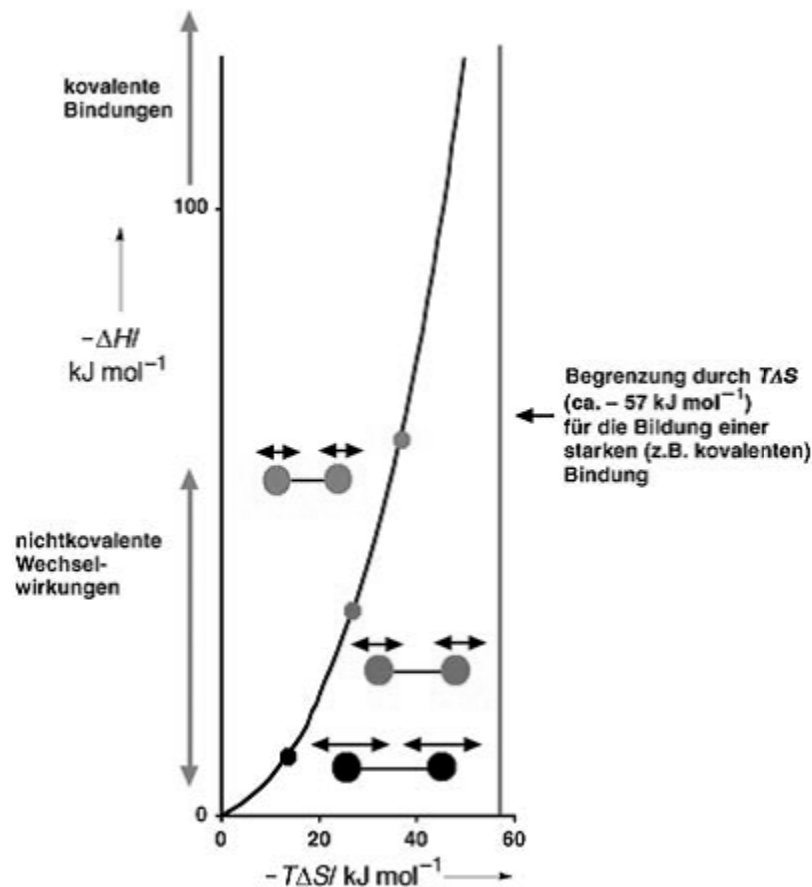


Abbildung 7 Schematische Beziehung zwischen Enthalpie- und Entropieaufwand einer Bindung bei 298 K [37]

Wie aus **Abbildung 7** ersichtlich wird, sinken die relativen entropischen Beiträge zu ΔG (schwarze Kurve) mit zunehmend stärkeren Bindungen. Der angegebene Grenzwert von -57 kJ/mol stellt ein theoretisches Maximum dar. Bei diesem Wert würde der Ligand seine eigene Beweglichkeit, das heißt alle Translations- und Rotationsfreiheitsgrade, gegenüber dem Protein vollkommen verlieren. In realen Protein-Ligand-Komplexen beträgt dieser Wert nur ungefähr ein Zehntel. Ein Ligand ist daher auch im Komplex mit einem Protein noch sehr beweglich.

In einer älteren Untersuchung über Enthalpie-Entropie-Kompensation [52] wurde der Effekt für 136 Liganden und deren Bindung an 13 Makromoleküle untersucht. Die Aufspaltung in enthalpische und entropische Bindungsbeiträge erfolgte dabei durch Van't-Hoff-Analyse und ist daher mit großen Fehlern behaftet. Für Bindungsaffinitäten zwischen $100 \mu\text{M}$ und 10 pM

ergibt sich in dieser Studie ein linearer Zusammenhang zwischen enthalpischem und entropischem Beitrag (Abbildung 8).

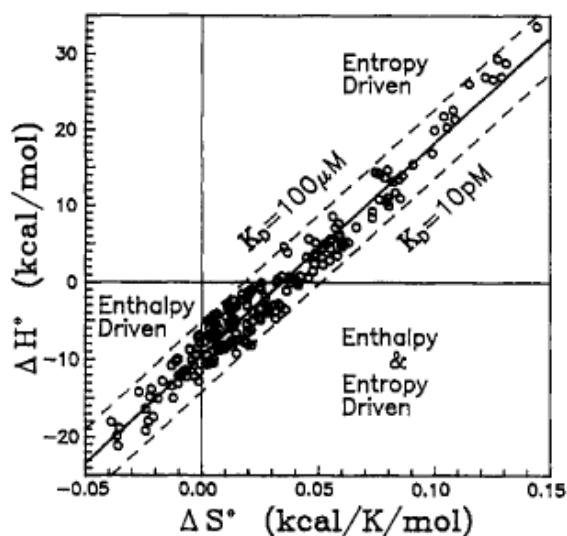


Abbildung 8 Lineare Enthalpie-Entropie-Kompensation nach [52]

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Linearität nicht unbedingt den real gegebenen Phänomenen entspricht, sondern dass der Verlust an Entropie und der Gewinn an Enthalpie sich nicht gegenseitig ausbalancieren müssen. Eine Untersuchung der entropischen und enthalpischen Bindungsbeiträge für neutrale Moleküle an makrozyklische Rezeptoren in Dichlormethan ergab einen nichtlinearen Zusammenhang (Abbildung 9).

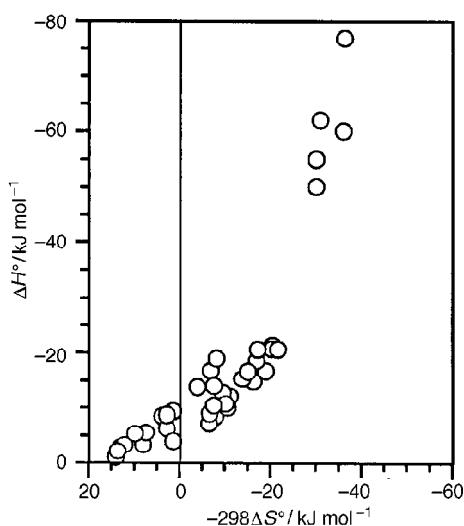


Abbildung 9 Nichtlineare Enthalpie-Entropie-Kompensation nach [23, 53]

Die Bandbreite an experimentellen Daten und theoretischen Überlegungen lässt bis heute nicht eindeutig entscheiden, ob das Phänomen der Enthalpie-Entropie-Kompensation einem linearen Zusammenhang folgt oder nicht. Da jedoch die theoretischen Überlegungen zur

Nichtlinearität auch durch experimentelle Befunde unterstützt werden [24], ist die Begrenzung der durch nichtkovalente Bindung reduzierbaren Freiheitsgrade eine plausible Erklärung für beobachtete Nichtadditivität bei Bindungsenergien.

1.5.4 Die Diskussion thermodynamischer Daten

Es bleibt festzuhalten, dass nur eine genaue thermodynamische Analyse einer Protein-Ligand Wechselwirkung ermöglicht, ein Verständnis für die Relevanz einzelner Vorgänge zu entwickeln. Da sich schon durch die Änderung einzelner Atome eines Interaktionspartners mehrere affinitätsbestimmende Parameter verändern, die sich zudem gegenseitig beeinflussen, ist grundsätzliche Vorsicht und Zurückhaltung bei der Interpretation thermodynamischer Daten geboten. Die Menge an möglichen Erklärungen für bestimmte thermodynamische Signaturen verleitet zu vorschnellen Erklärungsansätzen, daher besteht die Gefahr des Abdriftens ins Spekulative.

Der Weg zu einer soliden Deutung einzelner Bindungsaffinitäten kann daher nur über kleinschrittige Änderungen bei den Interaktionspartnern führen. Erst eine systematische Variation der Moleküleigenschaften verschafft die Möglichkeit, allgemeingültige Aussagen herauszuarbeiten. Weitere Voraussetzung ist der Einsatz verschiedener biophysikalischer Methoden, die einzelne affinitätsbestimmende Parameter sicher und präzise bestimmen lassen und sich im Idealfall gegenseitig bestätigen.

1.5.5 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Standardmethode zur Bestimmung der Affinität zwischen Ligand und Protein sind Enzymaktivitätsassays, bei denen die Spaltung eines chromogenes oder fluorogenes Substrates durch einen zugegebenen Inhibitor gehemmt wird. Ein weiteres verbreitetes Verfahren ist die Affinitätsbestimmung an immobilisierten Proteinen durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz [54], auch wenn dabei keine wirkliche Gleichgewichtseinstellung zugelassen wird. Aus Affinitätsdaten bei verschiedenen Temperaturen ist es theoretisch möglich, mit Hilfe der van't Hoff Gleichung (Gleichung 4) die Enthalpie zu berechnen. K_a ist dabei die Affinitätskonstante, T die absolute Temperatur und R die allgemeine Gaskonstante.

$$\frac{\partial \ln K_a}{\partial T} = -\frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4)$$

Da die Änderung der Wärmekapazität bei konstantem Druck ΔC_p meist ungleich null ist, muss die daraus folgende Temperaturabhängigkeit der Enthalpie ΔH berücksichtigt werden [55]. Mit zunehmender Temperatur wird die Bindungsenthalpie exothermer Reaktionen geringer. Im Bereich nicht-kovalenter Wechselwirkungen wird dies oft durch die auftretende Enthalpie-Entropie-Kompensation ausgeglichen, so dass Enthalpien, die nach van't Hoff berechnet werden, als fehlerbehaftet angesehen werden müssen [55].

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) stellt eine Möglichkeit dar, in Lösung direkt und ohne Reportergruppe die auftretende Bindungsenthalpie und gleichzeitig die Affinität eines Liganden zu seinem Zielprotein zu bestimmen. Daraus kann die Entropie nach Gleichung 2 berechnet werden. Diese Parameter können im Zusammenspiel mit struktureller Information durch Röntgenbeugungs- oder NMR-Experimente Informationen über Art und Stärke von Bindungen liefern. Des Weiteren kann bei Durchführung von Experimenten bei verschiedenen Temperaturen auch die Wärmekapazität ΔC_p , nach Gleichung 5 bestimmt werden.

$$\Delta C_p = \frac{(\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1})}{(T_2 - T_1)} \quad (5)$$

Die Änderung der Wärmekapazität wird mit der Oberflächenvergrabung durch Ligandenbindung assoziiert [56], doch ob diese Korrelation korrekt ist, wird diskutiert [57]. Aufgrund der häufig bei Temperaturerhöhung auftretenden Enthalpie-Entropie-Kompensation sind diese Werte häufig fehlerbehaftet und eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse schwierig, weshalb im Rahmen dieser Arbeit auf derartige Experimente verzichtet wurde.

Voraussetzung für die Durchführung eines ITC-Experimentes ist neben Löslichkeit und Stabilität von Protein und Ligand eine kinetisch ungehemmte Reaktion, die isothermal gestartet werden kann [58]. Für Protein-Ligand Komplexe, die im Rahmen des Wirkstoffdesign untersucht werden, wird dies im Allgemeinen als erfüllt angesehen.

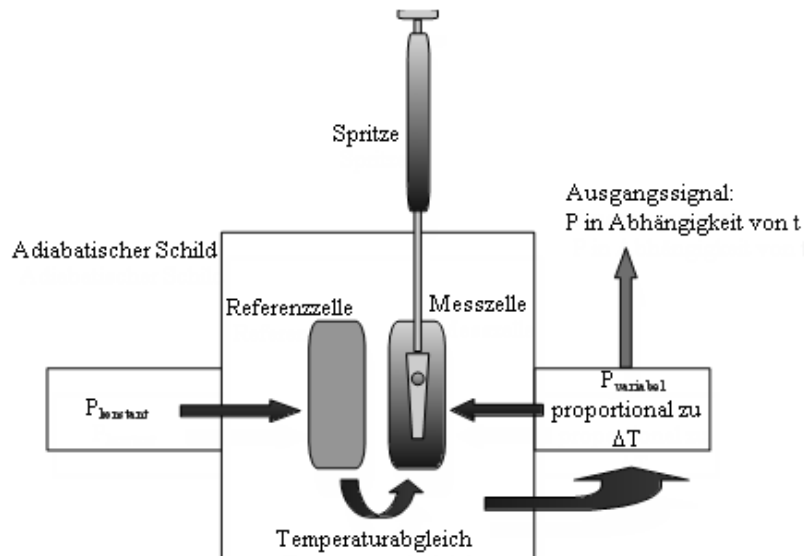


Abbildung 10 Schematischer Aufbau eines ITC-Geräts.

Die Enthalpie ΔH , die durch Bindung eines Liganden an ein Protein freigesetzt wird, ist die zu bestimmende Messgröße eines ITC-Experimentes [59]. Um diese Wärmemenge genau bestimmen zu können, findet ein Temperaturabgleich zwischen einer Mess- und einer Referenzzelle statt (**Abbildung 10**). Die Referenzzelle wird mit einer konstanten elektrischen Heizleistung P auf eine bestimmte Temperatur eingestellt, während die Leistungszufuhr für die Messzelle variabel gestaltet werden kann. Diese Leistung in Abhängigkeit der Zeit ist proportional zum Temperaturunterschied zwischen beiden Zellen und dient daher als gemessenes Ausgangssignal. Zum Beispiel wird die Leistung bei einer exothermen Reaktion innerhalb der Messzelle abfallen, da ein Teil der Wärmeenergie durch die Reaktion zur Verfügung gestellt wird und nicht von außen zugeführt werden muss. Dieses Messverfahren setzt zumindest bei den älteren Messgeräten voraus, dass die Umgebungstemperatur mindestens 5°C unter der Messtemperatur liegt. Um Informationen über die thermodynamischen Parameter eines Protein-Ligand-Systems zu erhalten, muss eine Titration durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde immer Ligandenlösung zu einer Proteinlösung titriert (**Abbildung 11**).

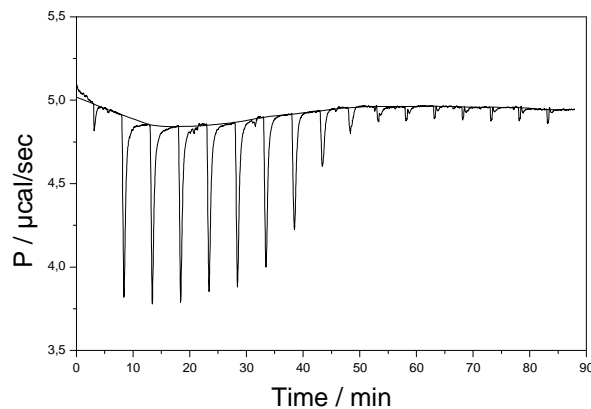


Abbildung 11 Typische Titrationskurve eines durchgeführten ITC-Experiments.

Im Idealfall ist zu Beginn der Titration jedes Signal für die bei der Injektion freiwerdende Wärme konstant, bis es zu einer fortschreitenden Sättigung des Proteins kommt. Ab diesem Punkt liegt ein Gleichgewicht zwischen freiem Protein, dem ungebundenen Liganden sowie des gebildeten Komplexes vor. Zusätzlich zugeführte Ligandenlösung bewirkt keine weitere Freisetzung von Reaktionswärme. Es wird allerdings Verdünnungswärme beobachtet, die unabhängig von der Reaktion durch Verdünnung von Ligand- und Proteinlösung auftritt und die bei der Auswertung berücksichtigt werden muss. Um die Verdünnungsenthalpie so gering wie möglich zu halten, müssen alle Lösungen aus identischen Puffern hergestellt werden. Eine Berücksichtigung der Verdünnungswärme kann entweder durch eine Leertitration von Lösungen ohne Ligand in Protein und Ligand in Pufferlösung oder durch Abzug einer konstanten Verdünnungswärme von allen Werten geschehen. Der Nachteil der ersten Methode besteht darin, dass sie für jedes Protein-Ligand-System durchgeführt werden muss. Der Abzug einer konstanten Verdünnungswärme setzt dagegen voraus, dass diese konstant und gegenüber der Reaktionswärme sehr gering ist. Dies war bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Fall.

Eine Auswertung [59] ist nur nach vorhergehender Integration aller Signale möglich. Die einzelnen Integrale der Leistung P nach der Zeit t entsprechen Wärmemengen Q (Gleichung 6).

$$Q_1 = \int_{t_0}^{t_1} P \cdot dt \quad (6)$$

Die Enthalpie ΔH berechnet sich nach (Gleichung 7) aus den einzelnen Wärmemengen Q .

$$Q = c_{Prot} \cdot V_0 (F_2 - F_1) \Delta H \quad (7)$$

Dabei ist c_{prot} die Konzentration des freien Proteins, V_0 das Zellvolumen und F der Anteil an gebundenem Protein (Gleichung 8). Vernachlässigt wird dabei die Volumenvergrößerung durch die Titration.

$$F = \frac{c_{PL}}{c_{Prot,ges}} \quad (8)$$

c_{PL} ist die Konzentration des Protein-Ligand Komplexes, $c_{Prot,ges}$ die gesamte Proteinkonzentration. Um K_a ermitteln zu können, wird zuerst das Massenwirkungsgesetz für eine einfache bimolekulare Reaktion aufgestellt (Gleichung 9). c_{Lig} und c_{Prot} werden durch die Gleichungen 10 und 11 ersetzt, so dass nach Umstellen die quadratische Gleichung 12 erhalten wird.

$$K_a = \frac{c_{PL}}{c_{prot} \cdot c_{Lig}} \quad (9)$$

$$c_{Lig} = c_{Lig,ges} - c_{PL} \quad (10)$$

$$c_{prot} = c_{prot,ges} - c_{PL} \quad (11)$$

$$c_{PL}^2 - \left(\frac{c_{prot,ges} + c_{Lig,ges} + 1}{K_a} \right) c_{PL} + c_{prot,ges} \cdot c_{Lig,ges} = 0 \quad (12)$$

Die positive Lösung dieser Gleichung ergibt die Konzentration des Komplexes c_{PL} in Abhängigkeit der Gesamtkonzentrationen der Bindungspartner.

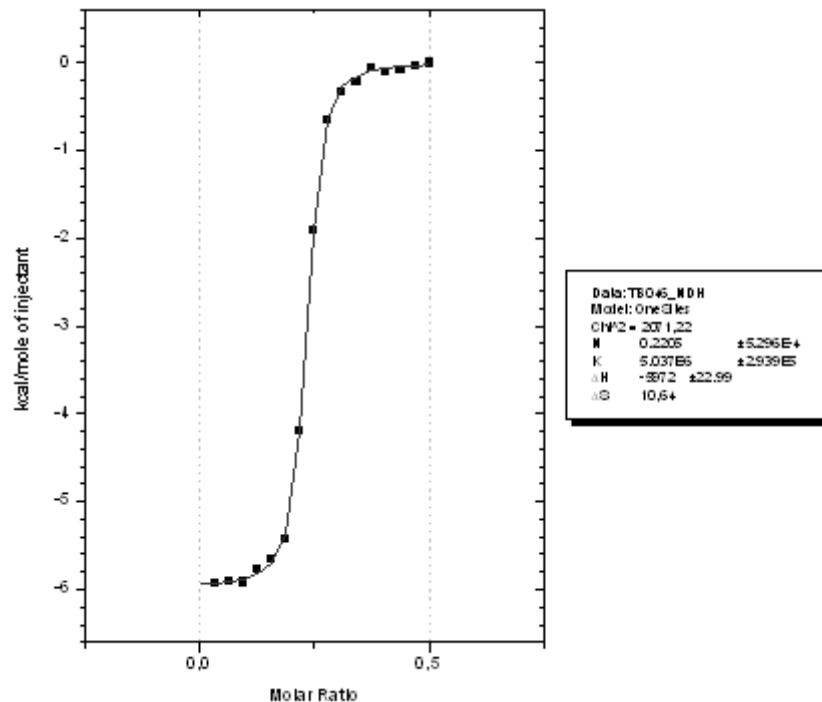


Abbildung 12 Bindungsisotherme eines durchgeführten ITC-Experimentes mit den berechneten Parametern.

Nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate kann nun eine Kurve durch die Punkte der einzelnen integrierten Injektionssignale an Gleichung 12 angeglichen werden, die eine Bindungsisotherme darstellt (**Abbildung 12**). So erhält man Werte für K_a und ΔH_{obs} . Aus diesen Werten kann nach Gleichung 1 ΔG und nach Gleichung 2 auch die Entropie ΔS berechnet werden. Mit dem verwendeten Kalorimeter können Affinitäten zwischen 1 nM und 1 mM bestimmt werden. In der Literatur [58] werden Schwellen für den Vergleich zweier Protein-Ligand-Komplexe angegeben, unterhalb derer eine Diskussion aufgrund systematischer Fehler nicht durchgeführt werden sollte. Für die ermittelten Größen ΔG und ΔH sind dies 4 kJ/mol und für die aus diesen Werten berechnete Entropie $-T\Delta S$ aufgrund der Fehlerfortpflanzung 8 kJ/mol.

Um eine ideale Titrationskurve zu erhalten, müssen die Konzentrationen von Protein und Ligand abgestimmt sein, um möglichst viele Datenpunkte im relevanten Kurvenbereich zu erhalten. Vor allem um die Affinität K_a genau zu bestimmen, müssen im steilen Kurvenabschnitt (**Abbildung 12**) mehrere Datenpunkte liegen. Allerdings muss der Übergang auch scharf und definiert sein, so dass ein Kompromiss gefunden werden muss [59]. Die Gestalt der Bindungsisotherme hängt von der Gleichgewichtskonstanten K_a und der Konzentration des Proteins ab, welche die Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen darstellt.

$$C = n[P]K_a \quad (13)$$

Gleichung 13 beschreibt den C-Wert, wobei n der stöchiometrische Faktor der Reaktion ist. Typischerweise sollte dieser C-Wert zwischen 10 und 100 liegen. **Abbildung 13** stellt simulierte Bindungsisothermen für verschiedene C-Werte bei gleicher Proteinkonzentration ($10 \mu\text{M}$) dar.

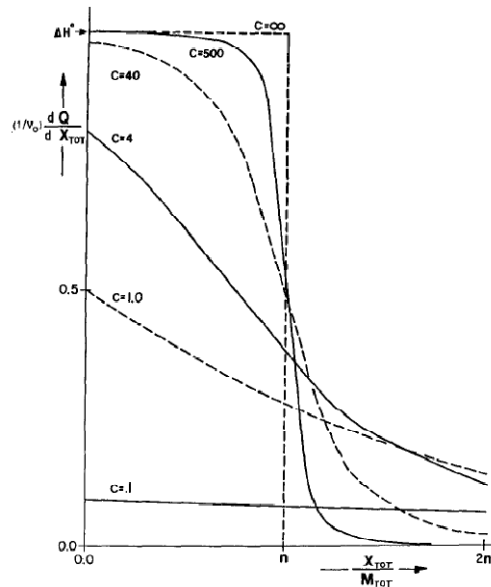


Abbildung 13 Simulierte Bindungsisothermen für verschiedene Parameter C [60].

Für zu niedrige Konzentrationen verlieren die Bindungsisothermen ihren sigmoidalen Verlauf ($C = 0.1, 1, 4$), und können daher nicht eindeutig ausgewertet werden, da sich die Enthalpie ΔH von Injektion zu Injektion kaum verändert. Bei zu hohen C-Werten kann der Übergang so scharf werden, dass keine Messpunkte auf dem steilen Teil der Kurve liegen, so dass eine Bestimmung von K_a ungenauer wird ($C = \infty$).

Die beobachtete Enthalpie ΔH_{obs} ist nicht mit der Bindungsenthalpie ΔH_{bind} zu verwechseln. Weitere Beiträge zur gesamten Enthalpie müssen von ΔH_{obs} abgezogen werden (Gleichung 14), um den Nettobeitrag der Enthalpie zur Bindungsaffinität zu erhalten.

$$\Delta H_{obs} = \Delta H_{bind} + \Delta H_{verd} + \Delta H_{unspez} + (\Delta n)\Delta H_{ion} \quad (14)$$

Neben der immer auftretenden oben beschriebenen Verdünnungsenthalpie ΔH_{verd} können weitere Enthalpien auftreten, die berücksichtigt oder vermieden werden müssen. Unspezifische Beiträge (ΔH_{unspez}) treten bei nicht genauer Übereinstimmung der Pufferlösungen oder unspezifischer Absorption an Gefäßwänden auf und können meist durch akkuratere Arbeitsweise minimiert werden.

Dagegen ist die Ionisierungsenthalpie ΔH_{ion} eine durch das Protein-Ligand-System verursachte Messgröße. Bei der Bindung des Liganden an das Protein können beide Bindungspartner Protonen mit dem Lösungsmittel oder untereinander austauschen. Falls die Summe der ausgetauschten Protonen ungleich null ist, wird eine Ionisierungsenthalpie beobachtet. Dies wird durch den Term $(\Delta n)\Delta H_{ion}$ berücksichtigt, wobei n die Anzahl der netto

ausgetauschten Protonen ist und ΔH abhängig von der Ionisierungsenthalpie der Pufferlösung ist. Durch Messung der gleichen Reaktion in verschiedenen Puffersystemen und anschließender Auftragung von ΔH_{obs} gegen ΔH_{ion} (**Abbildung 14**) kann aus der Steigung der Ausgleichsgeraden direkt n ermittelt werden.

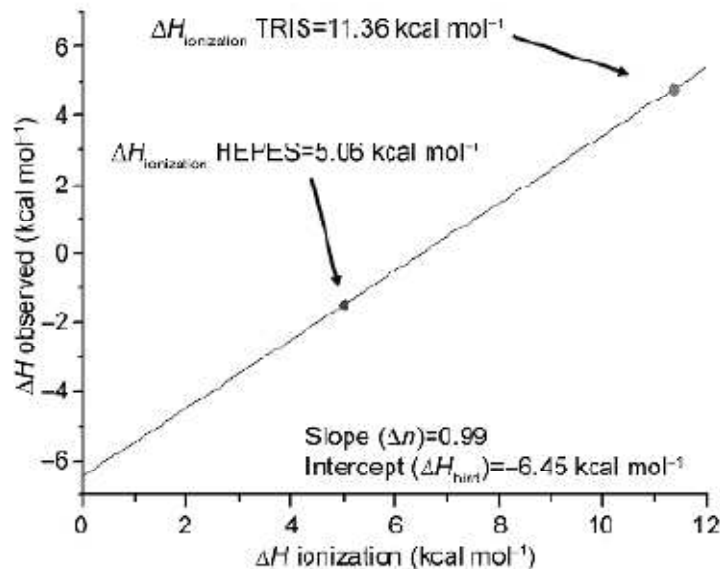


Abbildung 14 Enthalpiemessungen in verschiedenen Puffern zur Bestimmung der Änderung des Protonierungsgrades [59].

Der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse entspricht ΔH_{bind} . Aufgrund der Genauigkeit des Messverfahrens sollten Änderungen der Protonierungsgrade von Ligand und Protein durch Bindung nicht unter einem Wert von 0,25 diskutiert werden.

1.5.6 Röntgenkristallographisch bestimmte B -Werte als Indikator für dynamische Parameter

Ein globuläres Protein in Lösung ist ein flexibles System, einzelne Aminosäuren oder ganze Teile eines Proteins besitzen Freiheitsgrade, die ihnen eine thermische Bewegung ermöglichen. Ein Großteil dieser Freiheitsgrade geht bei der Kristallisation verloren, besonders an Kontaktflächen der Proteinmoleküle in der Kristallpackung der asymmetrischen Einheiten sind die Bewegungsmöglichkeiten der Aminosäureseitenketten stark eingeschränkt. Da ein Proteinkristall jedoch zu einem hohen Prozentsatz (30-70 %) aus Wasser besteht, ist grundsätzlich bei Raumtemperatur eine Dynamik im Kristall vorhanden, die eine gewisse Relevanz für die Verhältnisse in Lösung haben sollte. *Soaking*-Experimente belegen eindrucksvoll, dass ein Inhibitor durch Diffusion selbst in eine vergrabene Bindetasche eindringen und eine Änderung in der Bindetaschenkonformation verursachen kann.

Bei der unter *cryo*-Bedingungen durchgeführten Röntgenkristallographie wird der Proteinkristall nach dem *soaking* in flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von ca. 110 K gekühlt und somit schockgefroren. Es kann davon ausgegangen werden, dass dadurch zuvor dynamische Teile des Protein-Inhibitor-Komplexes über den Kristall eine Bandbreite von stabilen Konformationen einnehmen und dass die Größe der Abweichung einzelner Konformationen ungefähr der Größe der vorherigen thermischen Bewegung entspricht.

Bei der Verfeinerung einer röntgenkristallographischen Proteinstruktur werden neben den Koordinaten der einzelnen Atome auch die sogenannten *B*-Werte oder Temperaturfaktoren berechnet. Diese sind das durchschnittliche quadratische Mittel der Abweichungen von der Durchschnittsposition und somit ein Maß für die Auslenkung der Atome von der Gleichgewichtsposition (Variabilität der Koordinaten) über den Kristall. Färbt man die einzelnen Atome entsprechend ihrer *B*-Werte ein (*blau* geringer, *grün* mittlerer bis *rot* hoher *B*-Wert), so erkennt man, dass vor allem an der Proteinoberfläche hohe *B*-Werte und somit hohe Dynamik bzw. Unordnung beobachtet werden (**Abbildung 15**). Im Inneren des Komplexes und vor allem im Bereich der Bindetaschen erscheinen dagegen niedrige *B*-Werte, die eine geringe Flexibilität der Aminosäuren reflektieren.

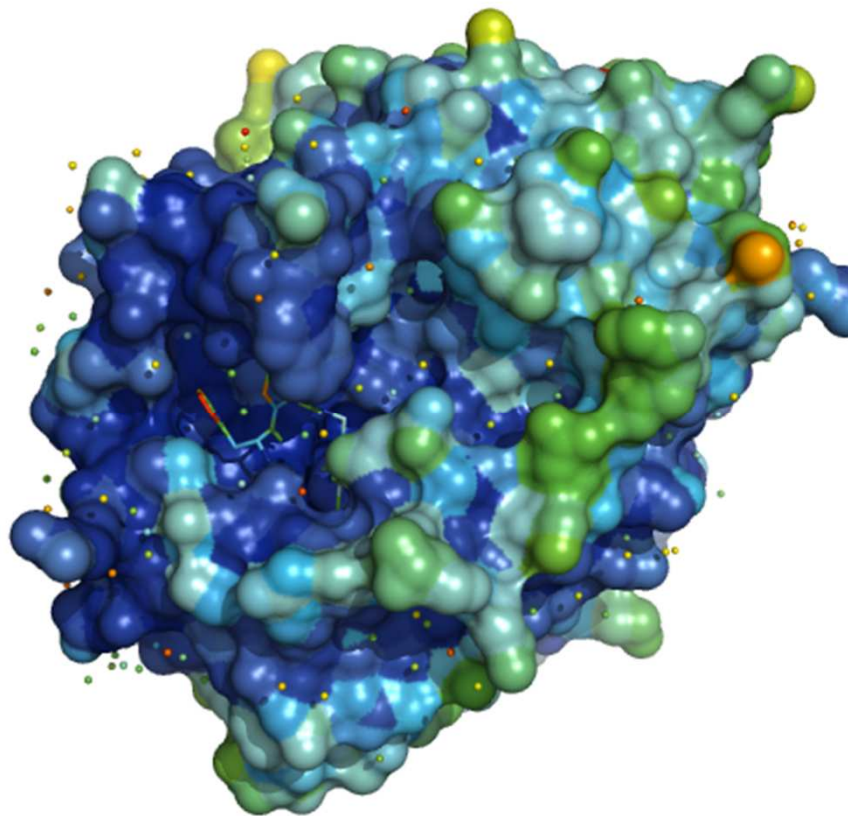


Abbildung 15 Inhibitor UB_THR_32 in Komplex mit Thrombin. Farbcodierung aller Atome nach *B*-Werten von blau (niedrig) nach rot (hoch). PDB-Code 2ZDA.

Bei der Berechnung der Temperaturfaktoren wird davon ausgegangen, dass jedes Atom die Besetzung 1 hat, also in jeder asymmetrischen Einheit genau einmal vorkommt. Während dies bei Atomen des Proteins vorausgesetzt werden kann, ist dies bei einem durch *soaking*, also durch eine Gleichgewichtseinstellung in den Kristall eingebrachten Inhibitor, nicht zwingend der Fall. Eine reduzierte Population des Liganden führt zu einer verringerten Elektronendichte, die in der Verfeinerung entweder durch einen Populationsparameter < 1 berücksichtigt wird oder aber, bei Fixierung dieses Parameters auf z.B. 1, steigen die Temperaturfaktoren auf größere Werte.

Es besteht eine sehr hohe, kaum vermeidbare Korrelation zwischen Besetzung und *B*-Wert, so dass nur für Inhibitormoleküle mit hoher Affinität eine sinnvolle Auswertung der *B*-Werte begründet erscheint, da man dort von einer nahezu vollständigen Population im Protein-Inhibitor-Komplex ausgehen kann. Für schwächer bindende Inhibitoren können die *B*-Werte der einzelnen Inhibitoratome nur untereinander verglichen werden, ein Vergleich mit anderen Proteinstrukturen ist nicht zulässig.

Weiterhin ist zu beachten, dass neben dynamischer Unordnung auch kristallographische Unordnung die *B*-Werte beeinflusst. Neben Fehlstellen im Kristall kann auch eine lange *soaking*-Prozedur zu erheblichen Kristallbaufehlern führen und somit die *B*-Werte für die gesamte Struktur erhöhen. Ein direkter Vergleich von *B*-Werten aus verschiedenen Strukturen ist also nicht sehr aussagekräftig, da diese erheblich von der Kristallqualität beeinflusst werden. Ein sinnvoller Vergleich ist nur nach vorheriger Normierung auf den mittleren *B*-Wert der gesamten Struktur oder besser wie in dieser Arbeit auf den mittleren *B*-Wert der *Active-Site* möglich. Werden diese Vorsichtsmaßnahmen beachtet, so sind Temperaturfaktoren zumindest qualitativ ein gutes Instrument, um flexible und starre Bereiche in einem Enzym-Inhibitor-Komplex zu identifizieren und die Unterschiede in der Dynamik in verschiedenen Komplexen zu vergleichen.

1.5.7 Die Bedeutung thermodynamischer Daten für das strukturbasierte Wirkstoffdesign

Die Bindungsaffinität eines Enzyminhibitors zum Zielprotein kann auf vielfältige Weise gemessen werden. Kinetische Bindungsassays, bei denen Änderungen der Licht- oder UV-Absorption durch Umsatz von Substrat oder Cofaktoren gemessen werden, sind dabei Methode der Wahl in den meisten *High-Throughput-Screenings* und bei der *Lead-Optimization*. Vorteile dieser Methoden sind der geringe Proteinverbrauch und die leichte Automatisierbarkeit, wofür Nachteile wie hohe Anfälligkeit für unspezifische Hemmung, Verfälschung der Ergebnisse durch z.B. hydrophobe Aggregation des Proteins auf durch Mizellenbildung entstandener Oberfläche von sogenannten *promiscuous inhibitors* [61, 62]

sowie die Abhängigkeit von einem geeigneten Substrat in Kauf genommen werden. Auch die Messung der Bindungsaffinität mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Biacore® etc.) liefert reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse in großem Maßstab, zusätzlich auch die zur Beurteilung pharmakokinetischer Parameter wichtigen k_{on} und k_{off} . Hierfür ist jedoch eine aufwändige Immobilisierung des Proteins notwendig, die ebenso wie die im üblichen Messverfahren nicht erlaubte Gleichgewichtseinstellung die Übertragung der Affinitätsdaten auf *in-vivo*-Bedingungen fraglich macht.

Die genannten Methoden bestimmen die Gesamtaffinität des Inhibitors zu seinem *Target*-Protein, welche neben der Selektivität in der frühen Phase der Wirkstoffentwicklung die wesentliche zu optimierende Größe ist. Da diese Gesamtaffinität für verschiedene Inhibitoren aus sehr unterschiedlichen Beiträgen zusammengesetzt sein kann, ist es für die Entscheidungsfindung bei der Optimierung einer Leitstruktur wünschenswert, detailliertere Information über einzelne Beiträge zu erhalten. Mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie kann die Bindungsaffinität in enthalpische und entropische Anteile faktorisiert werden und somit deren Abhängigkeit vom Anfügen bzw. Austauschen funktioneller Gruppen oder anderer Variationen an dem Wirkstoffkandidaten verfolgt werden.

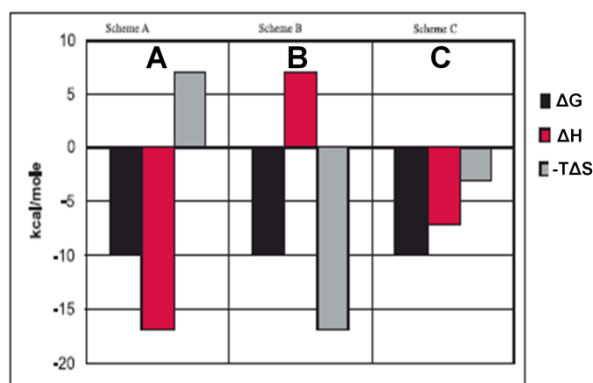


Abbildung 16 Beispiele entropisch (B) und enthalpisch (A) getriebener Bindung, sowie ausgewogenes thermodynamisches Profil (C) bei konstanter Affinität [63].

Die drei Beispiele in **Abbildung 16** sollen deutlich machen, dass bei gleich bleibender Affinität verschiedenste Zusammensetzungen der Bindungsenergien möglich sind. Es existieren stark enthalpisch (A) oder entropisch (B) bindende Liganden, aber auch ausbalancierte Bindungsverhältnisse (C) sind möglich. Diese Daten charakterisieren eine Protein-Ligand Wechselwirkung und können beim rationalen Wirkstoffdesign helfen, affinere Liganden zu entwickeln. Zum besseren Verständnis sind Veränderungen dieses thermodynamischen Profils besonders interessant, die durch minimale Änderungen am Liganden hervorgerufen werden. So können einzelne Effekte gesondert beobachtet, die Stärke einzelner Bindungen festgestellt, sowie kooperative Effekte entdeckt werden.

Besonders im Zusammenspiel mit strukturellen Informationen z.B. aus der Röntgenkristallographie kann sich somit ein klareres Bild ergeben, welche Effekte im Detail die Bindungsaffinität beeinflussen. Die Daten aus der ITC sind zwar oft schwer interpretierbar und deutlich weniger intuitiv verständlich als die anschaulicheren und dem menschlichen Geist zugänglicheren graphisch darstellbaren Ergebnisse aus der Kristallographie. Dennoch ermöglichen sie dem medizinischen Chemiker mit einiger Übung, eine rationellere Entscheidungsfindung und auch ein "besseres Gefühl" bei durch thermodynamische Daten gestützten Entscheidungsprozessen.

Für welche Fragestellungen ein *Thermodynamic Profiling* der Protein-Inhibitor Wechselwirkung hilfreich sein kann sei im Folgenden zusammengefasst:

- Durch den häufig beobachteten Effekt der Enthalpie-Entropie-Kompensation werden enthalpische Optimierungen wegen der auftretenden *entropic penalty* oft gar nicht bemerkt, wenn nur die Gesamtaffinität gemessen wird. Die Beobachtung, dass z.B. eine eingefügte funktionelle Gruppe den enthalpischen Beitrag zur Bindung erhöht, obwohl dieses durch einen negativen entropischen Beitrag kompensiert wird, ermöglicht jedoch Strategien, wie diese Kompensation minimiert werden kann.
- Ein hoher enthalpischer Beitrag zur Bindung resultiert vor allem aus gerichteten, in Winkel und Abstand optimierten Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken. Daher ist die Identifizierung enthalpischer Binder und die Optimierung der Affinität in Richtung enthalpische Bindung auch immer hilfreich bei der Erzeugung der nötigen Selektivität gegenüber strukturverwandten Proteinen.
- Gerade zu Beginn einer Wirkstoffsuche mit Hilfe von *Screening*-Verfahren ist es nötig Entscheidungen für bestimmte Leitstrukturen zu treffen, die weiter optimiert werden sollen. Hier kann das Wissen über den enthalpischen Bindungsbeitrag wichtig sein, denn Leitstrukturen mit enthalpischer Bindungssignatur weisen bereits gute elektrostatische Interaktionsmuster mit dem Zielprotein auf. Der entropische Beitrag zur Bindung ist dann durch das Hinzufügen von hydrophoben Kontaktflächen und Rigidisierung des Inhibitors leichter zu optimieren, als die Identifizierung und Optimierung neuer Wasserstoffbrücken [64].
- Zusammen mit strukturellen Daten lassen sich Wasserstoffbrückenpartner identifizieren, die sich in räumlich bereits strukturierten Teilen des Proteins befinden. Da diese durch die Ligandenbindung nur eine geringe weitere Einschränkung ihrer Freiheitsgrade erfahren, ist die zu erwartende *entropic penalty* geringer als in flexiblen Bereichen des Proteins. Bei der Auswahl der Wasserstoffbrückenpartner auf Seiten des Proteins sollten im Falle von Antiinfektiva dabei solche Aminosäuren vermieden werden, deren häufige Mutation im Zielprotein bereits bekannt ist.
- Für bestimmte Zielproteine, die wie z.B. die HIV-Proteasen starken Mutationsabwandlungen unterliegen, kann es sinnvoll sein, das Inhibitormolekül

nicht zu starr zu gestalten. Ein solcher flexibler Ligand wird zwar einen geringeren entropischen Beitrag zur Bindung liefern, kann dafür aber durch seine Flexibilität auch bei Mutationen im *Target* noch eine Inhibition bewirken. Diese Eigenschaft ermöglicht es, einen antiinfektiven Arzneistoff zu entwickeln, gegen den sich Resistenzen langsamer und seltener ausbilden [65].

- ITC ermöglicht durch Messungen in Puffern mit verschiedenen Ionisierungsenthalpien die Identifikation von Protonierungsänderungen bei der Komplexbildung, welche die Bindungsaffinität stark beeinflussen können. Die Kenntnis über diese Prozesse trägt zum Verständnis der Affinitätsbeiträge einzelner funktioneller Gruppen bei und erlaubt die Charakterisierung der für die Inhibitorbindung entscheidenden Ladungszustände einzelner protonierbarer Aminosäuren. Diese Informationen erlauben die Optimierung des Inhibitors für die physiologischen Bedingungen des Zielproteins

1.6 Thrombin als Zielmolekül für das Wirkstoffdesign

Auch wenn die Entwicklung eines Thrombinhemmstoffes als Wirkstoffkandidat nicht Ziel dieser Doktorarbeit war, so soll doch auf die Relevanz dieses *Targets* für die Forschung nach modernen Antikoagulantien eingegangen werden.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in Deutschland immer noch die häufigste Todesursache. Über die Hälfte aller Todesfälle wird durch thromboembolische Ereignisse verursacht, vor allem durch Herzinfarkt und Schlaganfall. Nach den koronaren und zerebralen sind venöse Thromboembolien die dritthäufigste Gefäßerkrankung. Folgeerkrankungen wie das postthrombotische Syndrom und das *Cor pulmonale* belasten nicht nur die Patienten, sondern verursachen auch enorme Kosten für das Gesundheitssystem [66]. Vor diesem Hintergrund sind Arzneistoffe zur wirksamen und sicheren Therapie sowie vor allem zur Prophylaxe thromboembolischer Erkrankungen von großer Bedeutung.

1.6.1 Physiologische Grundlagen: Das System der Blutgerinnung [67]

Um nach Verletzungen eine normale Blutstillung zu gewährleisten und notwendige Reparaturprozesse einzuleiten, verfügt der menschliche Körper über ein fein reguliertes Blutgerinnungssystem. Die lebenswichtige Balance zwischen pro- und antikoagulativen Effekten wird in einem funktionierenden Blutgerinnungs- und Fibrinolysesystem durch ein Netzwerk aus biochemischen Prozessen geregelt. Eine Störung dieses fein regulierten Systems kann zum Ausbleiben der Blutgerinnung und somit zum Blutverlust selbst bei kleinen Verletzungen führen, oder zu einer übersteigerten Gerinnungsneigung und somit zu Thrombosen und Embolien.

Die Blutstillung wird in primäre und sekundäre Hämostase unterteilt, zwei hochkomplexe und miteinander gekoppelte Prozesse.

Unmittelbar nach einer Verletzung führt die primäre Hämostase zur Bildung eines vorläufigen, reversiblen Thrombozytenpropfes durch Anlagerung von Thrombozyten an die Wundränder. Als Anker für die Plättchenadhäsion dient dabei der bei einer Gefäßverletzung exponierte von-Willebrand-Faktor. Es kommt zu einer Aktivierung der über ihre GP-Ib/IX-Rezeptoren angelagerten Blutplättchen und somit zu einem Gestaltwandel (*shape change*) der Thrombozyten und einer damit verbundenen Freisetzung von Serotonin, Adenosindiphosphat (ADP), Plättchenfaktor 4 und anderen Mediatorstoffen. Serotonin bewirkt eine lokale Vasokonstriktion im verletzten Gewebe und unterstützt somit die Blutstillung, ADP aktiviert weitere Blutplättchen und Plättchenfaktor 4 inaktiviert zusätzlich das gerinnungshemmende Heparin. Der innerhalb weniger Minuten entstehende

Thrombozytenpfropf ist allerdings nicht für einen dauerhaften Verschluss der Wunde geeignet [68, 69].

Die sekundäre Hämostase, die eigentliche Blutgerinnung, gewährleistet einen sicheren Wundverschluss durch Bildung eines stabilen Gerinnungsthrombus. Klassischerweise wird dabei zwischen zwei Aktivierungskaskaden unterschieden: Dem extrinsischen (extravaskulären) und dem intrinsischen (intravaskulären) Weg. Während die Gerinnungsaktivierung über die extrinsische Kaskade innerhalb weniger Sekunden stattfindet, läuft der intrinsische Weg deutlich langsamer ab.

Die meisten der Enzyme der Blutgerinnungskaskade gehören zu den trypsin-artigen Serinproteasen. Diese werden als Vorstufen (Zymogene) in Leberzellen gebildet und durch proteolytische Aktivierung in ihre enzymatisch aktive Form umgewandelt. Dadurch kommt es zu einem kaskadenartigen Ablauf der Blutgerinnung (**Abbildung 17**).

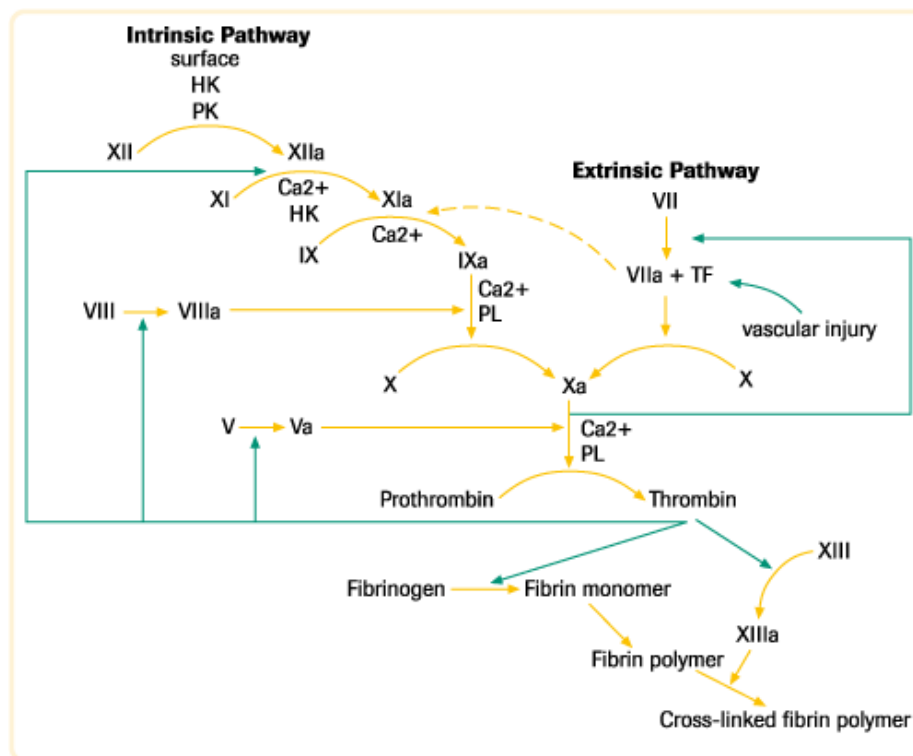


Abbildung 17 Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade[70]

Die Faktoren V, VIII und Protein S wirken als Kofaktoren und besitzen selbst keine proteolytische Aktivität. Faktor XIIIa gehört nicht zu den Serinproteasen, es handelt sich um eine Transglutaminase, die einen Cysteinrest als Nukleophil im aktiven Zentrum besitzt.

Die meisten enzymatischen Reaktionen der Gerinnungskaskade finden auf einer Phospholipidoberfläche (PL) statt. Solche Oberflächen werden vor allem durch aktivierte Plättchen, aber auch von beschädigten Gefäßzellen bereitgestellt. Dies begrenzt die Koagulation auf den Ort der Verletzung und verhindert eine systemische Gerinnungsaktivierung. Die Bindung der Zymogene der Gerinnungsfaktoren auf der

Phospholipidoberfläche wird durch ihre Gla-Domänen ermöglicht, welche die ungewöhnliche Aminosäure γ -Carboxyglutaminsäure enthalten. Diese Komplexbildung ist Calcium-abhängig und entscheidend für die Aktivierbarkeit der Gerinnungsfaktoren. Hat die γ -Carboxylierung der Glutaminsäurereste nicht stattgefunden oder ist Calcium nicht in ausreichender Menge vorhanden, wird eine Komplexbildung auf der Phospholipidoberfläche verhindert, und die Aktivierungskette wird unterbrochen. Die Calcium-Abhängigkeit dieser Reaktionen ermöglicht außerdem die Nutzung von Komplexbildnern, wie z.B. Natriumcitrat oder EDTA, für die *in vitro*-Antikoagulation. *In vivo* ist diese Vorgehensweise nicht möglich, da ein systemischer Calcium-Entzug zu schwerer Tetanie führen würde.

Auslöser für den extrinsischen Gerinnungsweg ist die mit einer Gewebeverletzung verbundene Freisetzung von *Tissue Factor* (TF) aus subendothelialen Zellen. Freigesetzter TF bildet mit zirkulierendem Faktor VII (FVII) den aktiven TF/VIIa-Komplex, der in Gegenwart von Calcium-Ionen Faktor X (FX) aktiviert.

Die Aktivierung des intrinsischen Weges erfolgt durch Kontakt von Faktor XII (FXII) mit einer negativ geladenen Oberfläche, z.B. nach einer Verletzung. Sie kann aber auch durch körperfremde Materialien, wie Dialysesysteme, sowie entzündliche und arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßendothelien ausgelöst werden. FXII wird dadurch zu FXIIa aktiviert. Erste Spuren von FXIIa katalysieren in Gegenwart von hochmolekularem Kininogen (HMWK) die Umwandlung von Plasmapräkallikrein zu Plasmakallikrein (PK), welches über einen positiven Rückkopplungs-Mechanismus (*feedback*) wiederum FXII aktiviert (Kontakt-Aktivierungssystem). Nach Bildung einer kritischen Menge an FXIIa erfolgt schließlich die kaskadenartige Aktivierung der Faktoren XI und IX. Faktor IXa (FIXa) bewirkt im Komplex mit Faktor VIIIa und Calcium-Ionen die Bildung von Faktor Xa (FXa).

Extrinsischer und intrinsischer Weg führen beide zur Aktivierung von FX. FXa bildet zusammen mit Calcium-Ionen und Faktor Va an einer Phospholipidoberfläche den so genannten Prothrombinasekomplex, welcher die Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) in aktives Thrombin (Faktor IIa) katalysiert.

Die Hauptaufgabe des gebildeten Thrombins ist die Fibrinbildung. Durch Abspaltung der Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen entsteht monomeres Fibrin, welches zu langen Strängen aggregiert. Die durch Thrombin aktivierte Transglutaminase Faktor XIIIa bewirkt eine kovalente Längs- und Quervernetzung der instabilen Fibrinfäden, wodurch ein stabiles Gerinnsel entsteht. Im letzten Schritt erfolgt eine durch Thrombosthenin ausgelöste Retraktion der Fibrinfäden. Dabei nähern sich die Wundränder weiter an und das Gerinnsel wird nochmals verfestigt.

Eine weitere Funktion des Thrombins ist die Aktivierung der ubiquitär vorkommenden Protease-aktivierbaren Rezeptoren PAR1 und PAR4. Thrombin ist der wirksamste bekannte Plättchenaktivator und spaltet den extrazellulären N-Terminus der PARs auf den

Thrombozyten. Die dadurch frei gesetzte rezeptorgebundene N-terminale Sequenz des PAR wirkt als eigener Agonist und löst so die Plättchenaggregation aus.

Neben den beiden Hauptwegen der Blutgerinnung bestehen auch Verknüpfungen zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Weg. So kann FVIIa neben FX auch FIX aktivieren. Weiterhin existieren positive Rückkopplungs-Mechanismen, welche die Blutgerinnung zusätzlich verstärken. Die meisten dieser positiven *feedback*-Reaktionen werden durch Thrombin ausgelöst, welches unter anderem die Faktoren V, VIII und XI aktiviert. Daneben ist FXa in der Lage, die Faktoren VII, VIII und IX zu aktivieren.

In Gegenwart von Thrombomodulin existiert ein negativer Thrombin-induzierter *feedback*-Mechanismus über die Bildung von Protein C, das den Gerinnungsprozess unterbricht. Protein C spaltet im Komplex mit Protein S als Kofaktor die Faktoren Va und VIIIa und verhindert somit eine weitere Aktivierung von FX und Prothrombin.

Um eine übermäßige Blutgerinnung zu verhindern, sind zusätzlich endogene Gerinnungshemmstoffe im Blut vorhanden. Der wichtigste dieser Inhibitoren ist das Serpin Antithrombin, ein in der Leber gebildetes α_2 -Globulin. Antithrombin bildet stabile Komplexe mit den freien Gerinnungsfaktoren Thrombin, Xa, IXa, XIa und XIIa und blockiert dadurch ihre aktiven Zentren. Diese Reaktion kann stark beschleunigt werden, wenn Antithrombin an Glykosaminoglykane wie Heparansulfat oder Heparin bindet, wodurch eine Konformationsänderung am Antithrombin induziert wird und die Wechselwirkungen mit dem Enzym verstärkt werden. Weitere endogene Inhibitoren der Gerinnungsproteasen sind α_2 -Makroglobulin, das unspezifisch Enzyme blockiert und so ihre biologische Aktivität unterbindet, sowie Heparin-Kofaktor II (HCII) und *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI).

Die Blutgerinnung befindet sich im Gleichgewicht mit der Fibrinolyse. Das fibrinolytische System hat die Aufgabe, intravasal entstehende Gerinnsel und nicht mehr benötigtes Fibrin (z.B. nach erfolgter Wundheilung) aufzulösen, um so Blutgefäße und andere Röhrensysteme, wie beispielsweise die Harnwege, von Fibrinablagerungen freizuhalten. Die Aktivierung der Fibrinolyse erfolgt durch Plasminogenaktivatoren oder das plasmatische Kontakt-Aktivierungssystem (FXIIa, HMWK und PK). Als wichtigster Plasminogenaktivator ist vor allem *Tissue-type Plasminogen Activator* (tPA) für die physiologische Fibrinolyse verantwortlich. tPA wird hauptsächlich in Gefäßendothelien gebildet und bei Bedarf ins Blut abgegeben. Die tPA-Freisetzung kann auch durch PK und die Freisetzung von Bradykinin ausgelöst werden, das ebenfalls eine direkte Aktivierung von Plasminogen bewirkt. Auch Urokinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator* oder uPA), das vor allem in der Niere synthetisiert wird und erstmals aus Urin isoliert werden konnte, zählt zu den Plasminogenaktivatoren. Urokinase wird auch von verschiedenen anderen Zellen gebildet und ist in seiner inaktiven Proform (sc-uPA) auch im Plasma vorhanden, wo FXIIa die Umwandlung von einkettiger sc-uPA in zweikettige Urokinase (tc-uPA bzw. uPA) vermitteln kann. Die Bedeutung der Urokinase in der Fibrinolyse ist nicht völlig geklärt. Man nimmt an, dass uPA eine größere Rolle beim

Gewebeumbau (*tissue remodeling*) und der Zellmigration spielt und deshalb das Tumorwachstum und die Metastasierung fördert.

Über diese Wege wird Plasminogen zu Plasmin aktiviert, welches schließlich Fibrin in lösliche Produkte abbaut. Plasmin spaltet auch die Faktoren Va und VIIIa und hemmt so direkt die Blutgerinnung. Außerdem baut es Fibrinogen ab, dessen Spaltprodukte ebenfalls gerinnungshemmend wirken. Auch das fibrinolytische System wird durch endogene Inhibitoren kontrolliert, wie z.B. α 2-Antiplasmin, welches schnell freies Plasmin bindet und deaktiviert, jedoch nur langsam mit lokal an Fibrin gebundenem Plasmin reagiert. Weitere Fibrinolyse-Inhibitoren sind *Plasminogen Activator Inhibitor Type 1* (PAI-1) und die Carboxypeptidase *Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor* (TAFI). Auch α 2-Makroglobulin ist an der Hemmung der Plasminogenaktivatoren und von freiem Plasmin beteiligt.

Neuere Erkenntnisse geben Hinweise auf komplexere Zusammenhänge und unterscheiden nicht mehr streng zwischen intrinsischer und extrinsischer Gerinnung. Statt dessen werden die einzelnen Prozesse in überlappende Phasen unterteilt, die auf Oberflächen stattfinden und bei denen *Tissue Factor* als der primäre Auslöser der Hämostase gilt.

1.6.2 Medikamentöse antithrombotische Therapie

Antithrombotika lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die Thrombozytenaggregationshemmer, welche ausschließlich bei arteriellen Thromboembolien wirksam sind, und die Antikoagulantien, welche bei venösen und arteriellen Thromboembolien eingesetzt werden.

Thrombozytenaggregationshemmer werden vor allem zur Prophylaxe arterieller Thrombosen eingesetzt. Schon in geringer Dosierung bewirkt Acetylsalicylsäure (ASS - Aspirin®) durch kovalente Bindung an das aktive Zentrum eine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase-1 und somit eine Blockade der Synthese von Vorstufen des zur Plättchenaggregation notwendigen Thromboxans A₂. ASS wird auch in Kombination mit dem Vasodilatator Dipyridamol (Aggrenox®) eingesetzt. Weitere Hemmstoffe der Thrombozytenfunktion sind oral wirksame ADP-Antagonisten wie Clopidogrel (Iscover®, Plavix®) und Ticlopidin (Tiklyd®). Diese Stoffe blockieren die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung und verhindern dadurch deren Vernetzung über den Glycoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex. Auch direkte GP-IIb/IIIa-Antagonisten wie Abciximab (ReoPro®), Eptifibatid (Integrilin®) oder Tirofiban (Aggrastat®) werden als Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt, sind aber nur parenteral einsetzbar.

Antikoagulantien wirken direkt oder indirekt -durch Blockade ihrer Synthese- auf die Enzyme der Blutgerinnung ein. Vor allem direkte Antikoagulantien besitzen hohen therapeutischen Wert bei akuten thromboembolischen Ereignissen wie Herzinfarkt oder Angina Pectoris. Auch perioperativ ist eine Behandlung mit Antikoagulantien indiziert; hierbei wird

heutzutage noch immer auf die Blutgerinnungshemmung mit indirekten Antikoagulantien wie Heparine gesetzt, die mit Hilfe von Kofaktoren auf die Gerinnungsfaktoren einwirken.

Indirekte Antikoagulantien - Heparin und Analoga

Heparin, ein körpereigenes polyanionisches Polysaccharid, wird in Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet. Parenteral zugeführt hemmt es sofort die Blutgerinnung durch Bindung und Aktivierung von Antithrombin, welches schließlich vor allem Thrombin und FXa hemmt. Der für die Thrombinhemmung notwendige Komplex kann nur durch Heparine mit einer Kettenlänge von mehr als 18 Monomeren gebildet werden, kürzerkettige Heparine fördern dagegen vor allem die FXa-Hemmung.

Es stehen verschiedene Heparine für eine Therapie zur Verfügung: Unfraktioniertes Heparin (UFH) wird auch als Standardheparin bezeichnet und aus Schweinedarmmukosa und Rinderlunge gewonnen. Sein Molekulargewicht reicht von 3000 bis 30000 Da. Die Dosierung von UFH erfolgt aufgrund der nicht einheitlichen Zusammensetzung verschiedener Zubereitungen in Internationalen Einheiten (I.E.) und erfordert häufige Therapiekontrollen (*Monitoring*). Daher wird UFH vor allem in der Klinik zur kurzfristigen Prophylaxe und in akuten Fällen eingesetzt. Niedermolekulares Heparin (*Low Molecular Weight Heparin*, LMWH) mit einem mittleren Molekulargewicht von 4000 bis 6000 Da wird durch enzymatischen oder chemischen Abbau aus UFH hergestellt und hemmt verstärkt FXa. Durch die homogenere Zusammensetzung und die geringere Plasmaproteinbindung ist der gerinnungshemmende Effekt von LMWH besser vorhersagbar, wodurch in vielen Fällen auf ein regelmäßiges *Monitoring* verzichtet werden kann und auch eine längerfristige Anwendung außerhalb der Klinik möglich wird.

Neben den verschiedenen Heparinen werden auch die so genannten Heparinoide, die ebenfalls eine Heparin-artige, Antithrombin-abhängige Wirkung besitzen, therapeutisch eingesetzt. Heparinoide sind aus Schweinedarmmukosa gewonnene Gemische niedermolekularer Glykosaminglykane und hemmen - je nach Zusammensetzung - FXa sowie Thrombin. Ein Vertreter ist Danaparoid-Natrium (Orgaran®), das zur Vorbeugung von tiefen Venenthrombosen und zur Behandlung thromboembolischer Erkrankungen zugelassen wurde.

Aufgrund der Beobachtung, dass die Bindung von fünf spezifischen Zuckermolekülen an Antithrombin für die Wirkung des Heparins verantwortlich ist, wurden Wirkstoffe entwickelt, die nur aus diesem Heparinsegment aufgebaut sind. Diese synthetischen Pentasaccharide hemmen ausschließlich FXa. Sie besitzen den Vorteil chemischer Homogenität und einer geringeren molaren Masse verglichen mit Heparinen und Heparinoiden, sind allerdings ebenfalls nur parenteral anwendbar. In Deutschland ist das in Zusammenarbeit mit der Firma Organon entwickelte Pentasaccharid Fondaparinux-Natrium (Arixtra®) der Firma Sanofi-Aventis zur Thromboseprophylaxe nach größeren orthopädischen Eingriffen

zugelassen; mit Idraparinux befindet sich derzeit ein weiteres Pentasaccharid dieser Firmen in der klinischen Phase III.

Der wesentliche Nachteil der Heparine und der davon abgeleiteten Substanzen liegt in der Applikationsform, denn durch die parenterale Gabe (*i.v.* oder *s.c.*) ist eine Anwendung außerhalb der Klinik nur eingeschränkt möglich. Auch der indirekte Antithrombin-abhängige Wirkmechanismus limitiert den Einsatz von Heparinen. Ist aus irgendeinem Grund (z.B. bei Lebererkrankungen) nicht genug Antithrombin im Blut vorhanden, bleibt eine Heparin-Gabe wirkungslos. Ein weiterer Nachteil ist, dass Heparin lediglich frei im Blut zirkulierendes Thrombin hemmt, aber unwirksam bei Fibrin-gebundenem Thrombin ist. Außerdem kann Heparin schwere Nebenwirkungen hervorrufen. Neben Blutungen und verschiedenen allergischen Reaktionen kann es zu einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) kommen, bei der man zwei Formen unterscheidet: Die frühzeitig auftretende HIT vom Typ I verläuft nicht-immunogen und zumeist komplikationslos, während HIT II nach einer Latenzzeit von durchschnittlich 10 Tagen zu thromboembolischen Komplikationen führt. Diese werden dadurch ausgelöst, dass Heparin einen Komplex mit Plättchenfaktor 4 bildet, welcher als Antigen erkannt wird und somit eine IgG-vermittelte Plättchenaktivierung bewirkt. In diesen Fällen ist eine Weiterbehandlung mit Heparin nicht mehr möglich und eine alternative Behandlung mit Heparinoiden oder Hirudin indiziert.

Indirekte Antikoagulantien - Vitamin-K-Antagonisten

Die Synthese der meisten Gerinnungsfaktoren findet Vitamin-K-abhängig in der Leber statt. Dort erfolgt eine γ -Carboxylierung bestimmter Glutaminsäurereste in den Gerinnungsfaktor-Vorstufen unter Bildung von γ -Carboxyl-Glutaminsäure (Gla). Erst dadurch wird die Aktivierbarkeit des Proenzyms möglich. Die Derivate des 4-Hydroxycumarins, auch Cumarine, sind die wesentliche Wirkstoffgruppe der Vitamin-K-Antagonisten. Wichtige Vertreter sind u.a. Warfarin (Coumadin®) und Phenprocoumon (Marcumar®). Die Cumarine wirken durch Hemmung der Vitamin-K-Reduktase, was eine Blockade der Regenerierung von Vitamin-K-Hydrochinon aus Vitamin-K-Epoxid zur Folge hat. Bedingt durch diesen Mechanismus tritt die Wirkung der Vitamin-K-Antagonisten erst nach Verringerung der Konzentration noch im Blut vorhandener Gerinnungsfaktoren ein, wodurch eine Latenzzeit von 1-3 Tagen zustande kommt. Eine Akuttherapie ist mit diesen Antikoagulantien daher nicht möglich, sie werden vor allem zur Langzeittherapie eingesetzt. Zu beachten ist, dass auch die Synthese der gerinnungsregulierend wirkenden Faktoren Protein C und Protein S von der Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten betroffen ist. Da ihre Halbwertszeit deutlich geringer ist als die der Gerinnungsfaktoren, kann zu Beginn der Cumarin-Gabe ein durch Mangel an Protein C bedingtes erhöhtes Thromboserisiko bis hin zur Cumarinnekrose auftreten. Aus diesem Grund ist eine initiale zusätzliche Behandlung mit Heparin o.ä. unerlässlich.

Der große Vorteil der Vitamin-K-Antagonisten besteht in der Möglichkeit der oralen Applikation, was die Anwendung außerhalb der Klinik deutlich erleichtert. Allerdings besitzen Cumarine den Nachteil, dass, neben dem verzögerten Wirkbeginn, ihre Wirkung wegen der langen Halbwertszeit auch nach dem Absetzen noch lange erhalten bleibt. Häufige Nebenwirkungen sind Blutungskomplikationen und allergische Hautveränderungen. Da Absorption, Metabolisierung und Eliminierung stark von Patient zu Patient schwanken können, ist ein enges *Monitoring* erforderlich. Wegen der geringen therapeutischen Breite der Cumarin-Derivate können Wechselwirkungen mit zahlreichen Medikamenten und Nahrungsmitteln zu schweren Blutungen, aber auch zu anderen Komplikationen oder einem Wirkungsverlust führen.

Direkte Antikoagulantien - Hirudin und Analoga

Die stark gerinnungshemmende Substanz Hirudin wurde erstmals aus dem Drüsensekret des Blutegels *Hirudo medicinalis* gewonnen. Inzwischen wird das 65 Aminosäuren lange Polypeptid rekombinant hergestellt. Hirudin ist ein direkter Thrombininhibitor, welcher eine praktisch irreversible Hemmung des Thrombins bewirkt. Diese Wirkung ist Antithrombin-unabhängig, was ein Vorteil gegenüber Heparin ist. Parenteral applizierte rekombinante Hirudin-Derivate, z.B. Lepirudin (Refludan®) und Desirudin (Revasc®), werden therapeutisch vor allem postoperativ und in akuten Fällen eingesetzt, in denen Heparine kontraindiziert sind (z.B. bei HIT). Hauptnebenwirkungen sind auftretende Blutungen; zu allergischen Reaktionen kommt es selten. Wie auch beim Heparin, liegt der entscheidende Nachteil in der parenteralen Applikationsform.

Fibrinolytika (Thrombolytika)

Während die Hauptaufgabe der Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulantien darin besteht, die Bildung und Entstehung von Thrombosen und die damit verbundenen klinischen Folgen zu verhindern, ist eine andere Gruppe von Substanzen notwendig, um schon bestehende Gerinnsel wieder zu beseitigen. Diese Fibrinolytika wirken indirekt über Plasminogenaktivierung und führen zur Fibrinolyse, d.h. der Auflösung von Gerinnseln. Verwendet werden uPA (rheothromb®), rekombinanter tPA (Alteplase - Actilyse® und Reteplase - Rapilysin®) sowie Streptokinase (Streptase®, aus *Streptococcus*-Arten). Ihr Einsatz ist wegen der hohen Blutungsgefahr streng an die Klinik gebunden und hauptsächlich bei akutem Myokardinfarkt, arteriellen und venösen Thrombosen der Extremitäten sowie Embolien indiziert. Eine gleichzeitige Gabe eines Fibrinolytikums mit ASS verhindert erneute Koronarverschlüsse bei Herzinfarkt-Patienten. Fibrinolytika können bei Überdosierung ebenfalls schwere Blutungen auslösen. In diesen Fällen kann ihre Wirkung durch Aprotinin (Trasylol®), ein Antifibrinolytikum, welches die Plasminbildung und -wirkung hemmt, antagonisiert werden. Dieses Produkt wurde jedoch im November 2007 aufgrund von Hinweisen auf erhöhte Nebenwirkungen vorübergehend weltweit vom Markt genommen.

1.6.3 Forschung nach neuen Antikoagulantien

Die aufgeführten Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmer ermöglichen heute eine effektive Prävention und Therapie thromboembolischer Erkrankungen und haben merklich zum Rückgang von Morbidität und Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse geführt. Allerdings besitzen alle verwendeten Stoffgruppen wesentliche Nachteile, durch die eine Behandlung neben hohen Kosten auch zu Einschränkungen in der Lebensqualität der Patienten führt. Insbesondere die parenterale Applikation der meisten Antikoagulantien verursacht durch den Bedarf an Fachpersonal gerade in der Langzeitprophylaxe enorme Kosten. Die für diese Indikation daher häufig gebrauchten Cumarin-Derivate sind zwar peroral verfügbar, besitzen aber ein starkes Neben- und Wechselwirkungspotential und erfordern wegen der engen therapeutischen Breite ein permanentes Gerinnungsmonitoring. Bedenkt man ferner, dass diese noch heute zur Standardtherapie zählenden Cumarine mit einer Plasmahalbwertszeit von 160 Stunden vor über 60 Jahren zunächst als Rattengift auf dem Markt etabliert wurden, so wird die Notwendigkeit für modernere Antikoagulantien deutlich. Die Suche nach einem „idealen Antithrombotikum“ beschäftigt daher die klinische Forschung und die pharmazeutische Industrie seit Jahrzehnten. Trotz der enormen Anstrengungen auf einem umkämpften und wachsenden Markt ist es jahrzehntelang nicht gelungen, einen Wirkstoff zu finden, der nach oraler Gabe gleichmäßig und schnell resorbiert wird, selektiv in eine weiterhin funktionierende Hämostase eingreift und neben klinischer Wirksamkeit ein auch für die Langzeittherapie akzeptables Nebenwirkungsspektrum aufweist sowie eine angemessene therapeutische Breite besitzt [71]. Weitere Idealeigenschaften wie vorhersagbare Pharmakokinetik unabhängig von Organfunktionen, lineare Dosis-Wirkungsbeziehungen, tägliche Einmalgabe, keine Interaktionen mit Nahrungs- und Arzneimitteln sowie rationale Kosten [66] lassen die Suche nach einem solchen Stoff an die mittelalterliche Suche nach dem Stein der Weisen erinnern.

Zu Erfolgen auf diesem Gebiet hat das strukturbasierte Wirkstoffdesign entscheidend beigetragen. Die rationale Entwicklung von direkten Hemmstoffen einzelner Gerinnungsfaktoren, vor allem von Thrombin und Faktor Xa, wurde durch die röntgenkristallographische Bestimmung von Proteinstrukturen in Komplex mit verschiedenen Inhibitoren und dem natürlichen Substrat Fibrinogen möglich [72, 73]. Die Kenntnis über die räumliche Struktur des aktiven Zentrums von Thrombin führte zu einer kaum überschaubaren Menge an Wirkstoffkandidaten, die in fast allen großen pharmazeutischen Betrieben getestet wurden [74].

Mit dem ausgehend vom natürlichen Inhibitor Hirudin (aus dem Blutegel *hirudo medicinalis*) entwickelten Hirulog (Bivalirudin) war zwar bald ein reversibler Thrombinhemmstoff gefunden [75], der aber als Peptid mit 20 Aminosäuren nur parenteral applizierbar ist. Die klinische Wirksamkeit ermutigte jedoch für die Suche nach niedermolekularen Inhibitoren. Ein erster Erfolg war Argatroban (Argatra®) [76] (**Abbildung 18**), das in Japan und seit 2002

auch in den USA als intravenöses Antikoagulans zugelassen ist, in Deutschland jedoch seit 2005 nur für die Nischenindikation HIT-Typ II. Weitere Inhibitoren wurden vom Fibrinopeptid A, dem Spaltprodukt des Fibrinogens, abgeleitet. Aus der Kenntnis der Struktur im Rezeptor ließen sich *D*-Phe-Pro-Arg-Derivate entwickeln, *in vitro* effektiv waren vor allem Benzamidinderivate, wie zum Beispiel NAPAP [71].

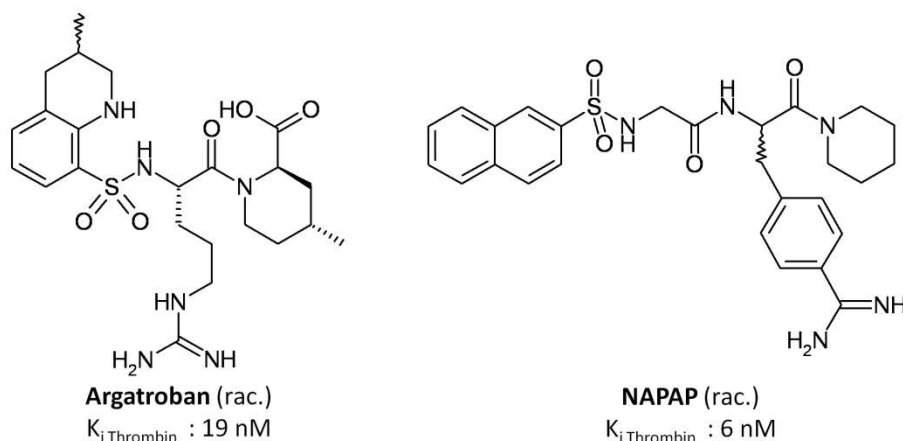


Abbildung 18 Niedermolekulare Thrombininhibitoren Argatroban und NAPAP

Ximelagatran

Erst im Juni 2004 gelang es der Firma AstraZeneca, mit Ximelagatran (Exanta®) einen Thrombinhemmstoff als das erste orale Antikoagulanz seit über 50 Jahren auf dem europäischen Markt einzuführen. Das doppelte Prodrug (**Abbildung 19**) besitzt eine orale Bioverfügbarkeit von 20 % und wird nach der Resorption schnell durch Reduktasen und Esterasen in seine Wirkform Melagatran umgewandelt.

Melagatran verfügt über den bekannten Benzamidinanker und ist ein kompetitiv-reversibler und selektiver Thrombinhemmstoff, der sowohl frei zirkulierendes als auch Fibrin-gebundenes Thrombin inhibiert [77-79]. Wie bei neuen Arzneistoffen üblich, war Ximelagatran zunächst nur eingeschränkt zugelassen zur Prophylaxe venöser thromboembolischer Ereignisse bei Patienten nach Hüftersatz- oder Kniegelenkersatz Operationen. Bereits während der Zulassungsstudien fiel der Wirkstoff durch einen reversiblen Anstieg der Lebertransaminase-Werte bei ca. 6 % der Patienten auf [80], was die US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA als Grund für die Verweigerung der Zulassung zu diesem wichtigen Markt ansah. Eine genaue Ursache hierfür wurde bisher nicht festgestellt, jedoch ist zu vermuten, dass die reduktive Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Oxim als Prodrug eine Belastung für bereits vorgeschädigte Leberzellen darstellen könnte.

Als Vorsichtsmaßnahme wurde Ximelagatran im Februar 2006 auch in Europa vom Hersteller vom Markt genommen. Anlass war der Bericht über eine(!) schwerwiegende, aber reversible Leberschädigung, die bei einer Patientin etwa drei Wochen nach Beendigung der 35-tägigen Therapie mit Ximelagatran eingetreten war. Über einen zeitlich so verzögerten Eintritt einer hepatobiliären Nebenwirkung unter prophylaktischer Dosierung war bis dahin noch nicht berichtet worden [66].

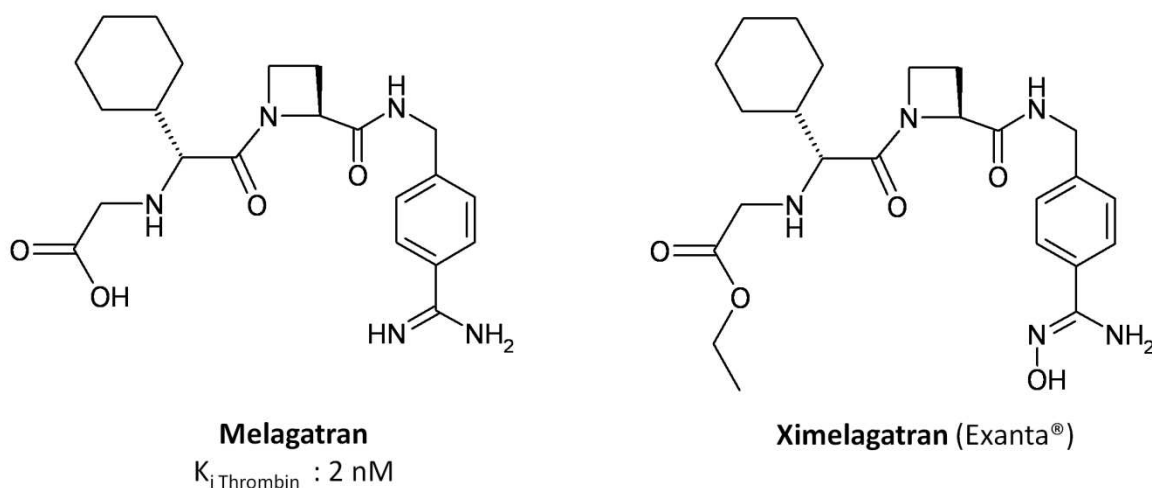
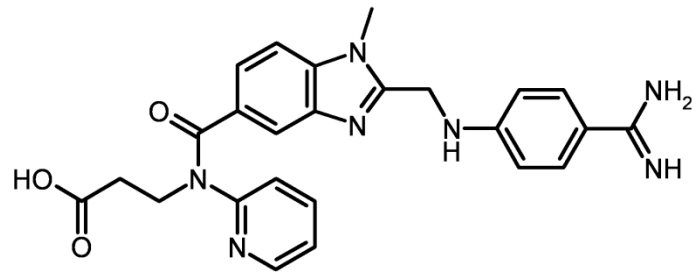


Abbildung 19 Melagatran und dessen doppeltes Prodrug Ximelagatran

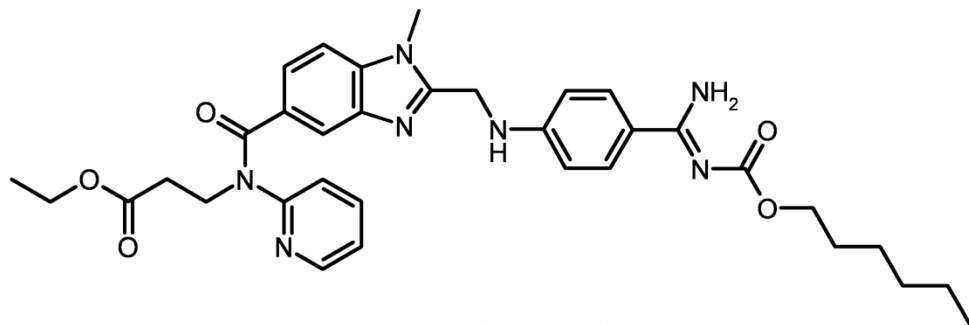
Dabigatran

Die Zulassung von Dabigatran-etexilat (Pradaxa®) erhielt Boehringer Ingelheim im April 2008, wiederum zunächst mit der eingeschränkten Indikation „Primärprävention von venösen thromboembolischen Ereignissen bei erwachsenen Patienten nach elektivem chirurgischen Hüft- und Kniegelenkersatz“.

Das Peptidomimetikum Dabigatran-etexilat (**Abbildung 20**) ist ebenfalls ein doppeltes Prodrug, und wird nach Resorption schnell in seine Wirkform Dabigatran umgewandelt. Wie bei Ximelagatran ist die Carboxylgruppe verestert, die basische Amidinogruppe liegt jedoch als *O*-n-Hexylcarbamat vor. Damit werden im Gegensatz zu Ximelagatran beide Prodrug-Funktionen durch Esterasen gespalten.



Dabigatran $K_{i \text{ Thrombin}}$: 9 nM



Dabigatran-etexilat (Pradaxa®)

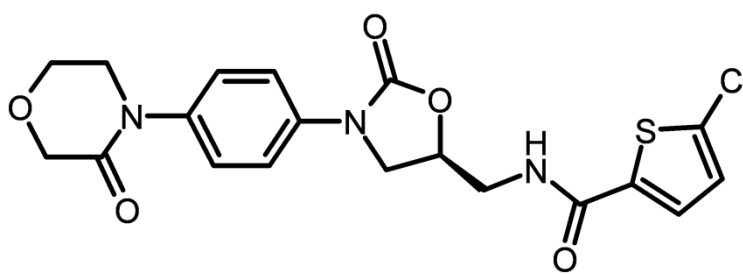
Abbildung 20 Dabigatran und dessen doppeltes Prodrug Dabigatran-etexilat

Trotz einer Bioverfügbarkeit von nur 3,5 - 5 % flutet der Wirkstoff nach peroraler Gabe schnell an, hat ein lineares pharmakokinetisches Profil, weist bei Gesunden eine Halbwertszeit von ca. 13 h auf sowie eine große therapeutische Breite und wird ausserdem kaum über Cytochrom-P450 verstoffwechselt.

Dabigatran hemmt reversibel sowohl fibringebundenes als auch freies Thrombin, es bindet nur gering (35%) an Plasmaproteine und wird nahezu unverändert zu 80 % über die Niere ausgeschieden [81]. Bislang hat Dabigatran bei keiner Studie leberschädigendes Potenzial gezeigt. Damit liegt der neue Wirkstoff nahe an den Anforderungen an ein ideales Antithrombotikum - die folgenden Jahre werden zeigen, ob sich das Produkt auf dem Markt etablieren kann.

Rivaroxaban

Eine weitere deutsche Innovation auf dem Markt ist Rivaroxaban (Xarelto®) (**Abbildung 21**) von Bayer-Schering, das von der europäischen Zulassungsbehörde EMEA im Juli 2008 zugelassen wurde. Der Hemmstoff des Gerinnungsfaktors Xa liegt im Gastrointestinaltrakt ungeladen vor und hat eine Bioverfügbarkeit von 80 %; eine Gabe von einmal täglich 10 mg überzeugte in Wirksamkeit und Verträglichkeit in großen Vergleichsstudien mit Heparin und Warfarin.



Rivaroxaban (Xarelto®)

K_i Faktor Xa : 0.4 nM

Abbildung 21 Der niedermolekulare Faktor Xa-Hemmstoff Rivaroxaban

Rivaroxaban ist Ergebnis einer Strukturoptimierung, nachdem Oxazolidone im Screening-Verfahren als FXa-Inhibitoren identifiziert wurden. Die Röntgenstrukturanalyse des FXa in Komplex mit synthetischen Inhibitoren gelang erst deutlich später als die des Thrombins [82, 83]. Inzwischen sind auch andere Hemmstoffe dieses Gerinnungsfaktors wie Apixaban (Bristol-Myers-Squibb), LY517717 (Lilly) und Otamixaban (Sanofi-Aventis) in der klinischen Entwicklung weit fortgeschritten.

Die Inhibierung des strukturverwandten Faktors Xa führt möglicherweise zu Vorteilen gegenüber der Thrombinhemmung. FXa ist das aktive Enzym im Prothrombinasekomplex, der die Bildung von Thrombin katalysiert. Durch eine Hemmung dieses Komplexes wird also die Neubildung von Thrombin blockiert, bereits gebildetes Thrombin wird jedoch nicht inhibiert. Die trotz einer Hemmung gebildeten Mengen an Thrombin reichen jedoch für eine funktionierende primäre Hämostase. Im Gegensatz zur Thrombinhemmung hat die Inhibierung von Faktor Xa keinen negativen Einfluss auf die für die Hämostase essentielle Plättchenfunktion. Daher ist zu vermuten, dass eine FXa-Hemmung zu weniger Blutungskomplikationen führt als bei anderen Antithrombotika und den direkten Thrombinhemmstoffen. Zudem ist der Aktivierungsschritt von Prothrombin zu Thrombin stark amplifiziert – ein Molekül FXa im Prothrombinasekomplex ist in der Lage, pro Minute

ca. 140 Moleküle Thrombin zu generieren. Daher könnten FXa-Hemmstoffe schon in geringer Dosierung eine zufriedenstellende antithrombotische Wirkung haben [67].

1.6.4 Ausblick – *in vivo veritas*

Die aufgeführten Beispiele für neue antikoagulative Wirkstoffe stellen Erfolge für das rationale Design von Arzneistoffen dar. Der Weg von der Kenntnis der Pathophysiologie der Blutgerinnung über die Identifizierung und Validierung geeigneter *Targets* bis zur durch Röntgenstrukturen unterstützten Optimierung von Leitstrukturen erwies sich zwar als Jahrzehnte dauernder Prozess mit dramatischen Enttäuschungen, der jedoch letztendlich zu Arzneistoffen führte, die den hohen modernen Anforderungen für eine Zulassung genügen. Jetzt müssen sich diese Stoffe in der klinischen Erprobung gegen die in der Langzeitprophylaxe etablierten und kostengünstigen Cumarine bewähren. Diese zunächst als Rodentizid eingesetzten Stoffe sind ein Beispiel der klassischeren Wirkstoffentdeckung: ihre gerinnungshemmende Wirkung wurde erkannt, als Kühe verbluteten, die bestimmte verdorbene Kleesorten fraßen. Eine heutige Zulassung dieser Vitamin-K Antagonisten als Arzneimittel wäre wohl kaum denkbar.

Welche Stoffe sich unter Kostendruck im Gesundheitssystem und der hohen Priorität auf Sicherheitsaspekte letztendlich durchsetzen, wird sich in den folgenden Jahren zeigen. Auch die Frage, ob eine Hemmung von Thrombin oder Faktor Xa oder duale Hemmstoffe beider Enzyme zu idealen Antikoagulationen führen, können nur langjährige klinische Studien zeigen.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Der Thermodynamische Referenzzustand

Die in dieser Arbeit gemessenen und diskutierten Änderungen der freien Gibbs Energie ΔG^0 sowie deren Einzelbeiträge ΔH^0 und $-T\Delta S^0$ sind bezogen auf einen Referenzzustand, der durch die verwendete Methode festgelegt ist. Bei den durchgeführten ITC-Experimenten liegen zu Beginn sowohl das Protein als auch der Inhibitor voneinander getrennt in einer Pufferlösung vor. Zu einer genaueren Beschreibung dieses Grundzustandes wurde eine *apo*-Kristallstruktur des Enzyms ohne gebundenen Inhibitor verfeinert. Da Thrombin zur Vermeidung der Selbstverdauung immer mit Benzamidin kokristallisiert wird, musste eine Möglichkeit zur Ausschwemmung des Benzamidins gefunden werden. Dies gelang durch das Eindiffundieren des sehr schwach bindenden Inhibitors UB_THR_17 über 2 Wochen in einen geeigneten Kristall, wodurch das durch die Kokristallisation vorhandene Benzamidin aus der Bindetasche verdrängt wurde. Der so erhaltene Datensatz konnte bis zu einer Auflösung von 1.50 Å verfeinert werden und wurde in der PDB mit dem Code 3D49 hinterlegt. Die Differenzelektronendichte für die Bindetasche zeigte neben einigen diffusen Dichtemaxima auch gut definierte Dichtep ea ks, welche Wassermolekülen zugeordnet werden konnten (**Abbildung 22**). Weiterhin fällt auf, dass Leucin 99 am rechten Rand der S3/S4-Tasche (roter Pfeil in **Abbildung 22**) in einer doppelten Konformation verfeinert wurde, was auf eine hohe Flexibilität dieser Aminosäure in der nur mit Wasser gefüllten Bindetasche hinweist.

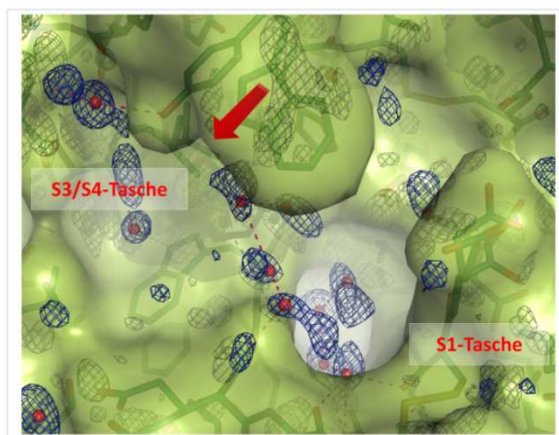


Abbildung 22 *Active Site* von Thrombin (grüne Oberfläche) ohne gebundenen Inhibitor. Die F_o-F_c -Differenzelektronendichte ist in blau bei 2σ dargestellt. Polare Wechselwirkungen der verfeinerten Wassermoleküle sind durch gestrichelte Linien in Magenta angedeutet. Der rote Pfeil markiert Leu99. PDB-Code 3D49.

Dieser bei hoher Auflösung kristallographisch zu beobachtende Zustand kann nur ein ungefähres Bild geben, wie das Enzym in Lösung vorliegt. Zwar ist die *Active Site* von

Thrombin in der Raumgruppe C2 nicht durch Kristallkontakte beeinflusst, dennoch wird sicher nur ein Teil der vorhandenen Dynamik des Systems in Form der *B*-Werte erfasst.

Wichtig für das Verständnis der Inhibitor-Bindung ist die Beobachtung, dass in allen Teilen der *Active Site* Wassermoleküle vorliegen, die durch mehrere Wasserstoffbrücken an das Protein gebunden sind und somit durch den Inhibitor verdrängt werden müssen. Besonders in der S1-Tasche existiert ein dichtes Netzwerk von Wassermolekülen für deren Verdrängung ein erheblicher enthalpischer Aufwand zu erwarten ist.

Anhand der *apo*-Kristallstruktur lässt sich ein präziseres Bild der thermodynamisch relevanten Vorgänge bei der Bindung eines beispielhaften Inhibitors an das Makromolekül entwerfen (**Abbildung 23**). Dabei ist neben der strukturellen Information wichtig, sich vor der Interpretation von Bindungsaffinitäten die Dynamik des Enzyms zu vergegenwärtigen. Diese wird in der Abbildung durch die Einfärbung nach *B*-Werten dargestellt. Die abgebildeten Strukturen besitzen aufgrund abweichender Kristallqualität unterschiedliche durchschnittliche *B*-Werte, somit sind sie untereinander nicht direkt vergleichbar.

Gleichzeitig ist zu beachten, dass ein Inhibitor je nach seinem Aufbau vor der Bindung ein flexibles System mit einer Hydrathülle ist. Dies soll *in silico* durch Angabe von vier verschiedenen mit der Software SYBYL minimierten Konformationen exemplarisch angedeutet werden.

Weiterhin beeinflussen möglicherweise überlagerte Säure-/Base-Gleichgewichte den Bindungsprozess. Während der exemplarische Inhibitor an seinem Benzamidinanker im experimentell untersuchten pH-Bereich mit Sicherheit protoniert vorliegt, so ist der Protonierungszustand der primären Aminfunktion stark vom exakten pH-Wert der Lösung abhängig. Der Protonierungsgrad der sauren und basischen Seitenketten der Aminosäuren im Protein hängt neben dem pH auch von der lokalen Dielektrizitätskonstante ϵ ab, die von dem Wert $\epsilon = 80$ in Wasser abweichen wird und durch die Bindung des Inhibitors abhängig von der lokalen Bindungsumgebung einen kleineren Wert annehmen wird.

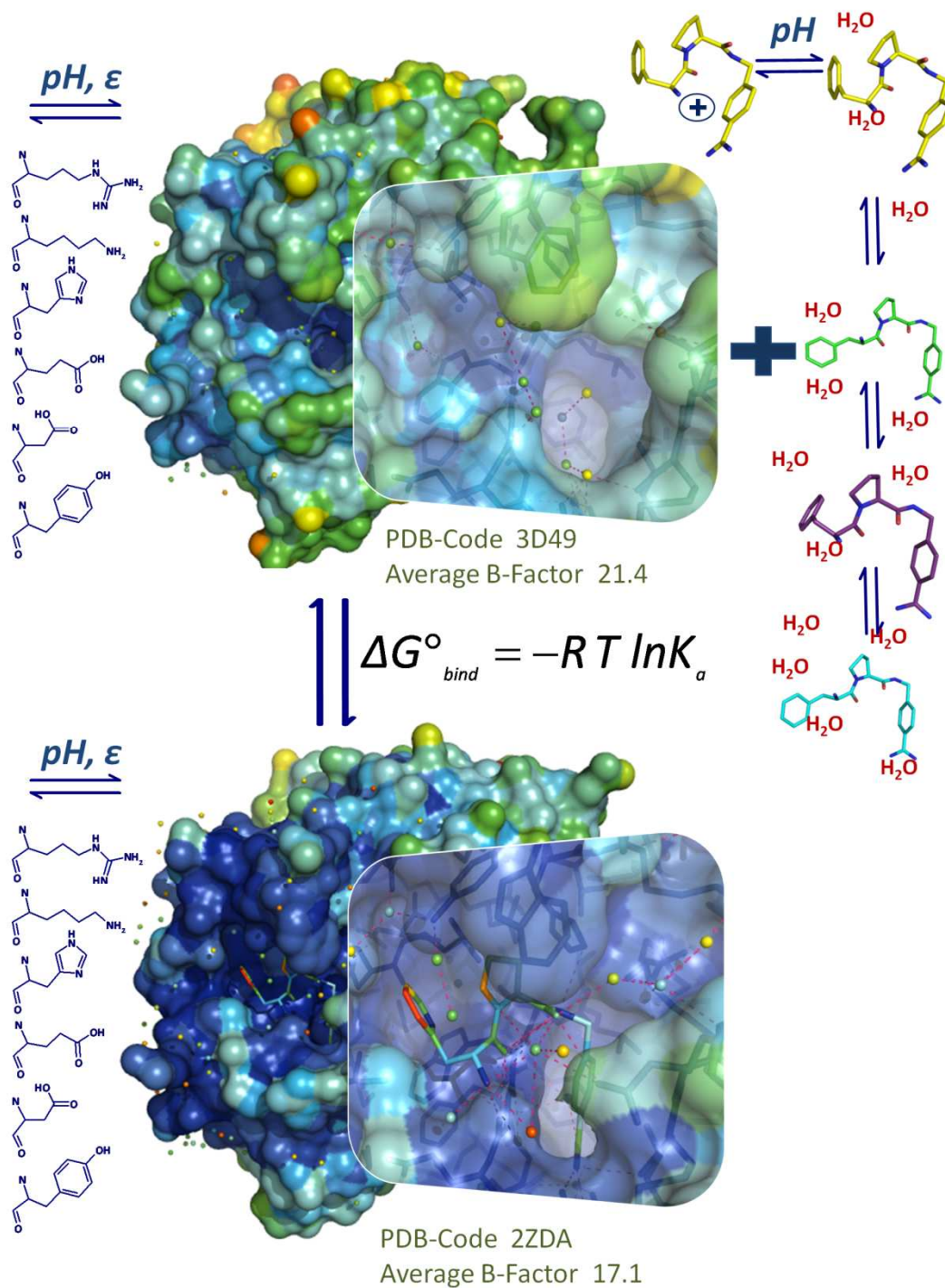


Abbildung 23 Thermodynamisch relevante Änderungen bei der Bindung eines Inhibitors an Thrombin. Einfärbung aller Atome des Enzyms, von Liganden und Wasser nach *B*-Werten. Neben der Ausbildung neuer Wechselwirkungen zwischen Protein, Inhibitor und Solvens beeinflussen überlagerte Säure-Base-Gleichgewichte und Änderungen in den Freiheitsgraden der interagierenden Moleküle die Lage des Gleichgewichtes.

2.2 Tabellarische Zusammenfassung aller gemessenen Daten

In der folgenden Tabelle sind alle kinetische gemessenen Hemmkonstanten K_i und die daraus berechnete freie Enthalpie ΔG^0 (*from K_i*), sowie die mikrokolorimetrisch bestimmte freie Enthalpie ΔG^0 (*from ITC*) und deren Komponenten ΔH^0 und $-\Delta S^0$ für die komplette Inhibitorenserie UB_THR aufgelistet. Zu den Messdaten ist die statistische Standardabweichung ($\pm SD$) aus jeweils mindestens doppelt (fast immer dreifach) durchgeführten Experimenten angegeben.

Wurde die Kristallstruktur der Inhibitoren in Komplex mit Thrombin gelöst, so ist der PDB-Zugriffscod aufgeführt.

Bei dem aufgelisteten Molekulargewicht der Inhibitoren ist berücksichtigt, dass diese als Mono- bzw. Dihydrochloride vorliegen.

Die den Codes zugeordneten Strukturformeln sind in **Abbildung 5** (Kapitel 1.4, Seite 16) aufgeführt, eine systematische Anordnung der Moleküle findet sich auf dem beiliegenden Poster.

Die Daten für die Inhibitoren UB_THR_1 bis UB_THR 12 entstammen Arbeiten von Christof Gerlach [84].

Die Kristallstrukturen von UB_THR 12, 13, 45, 46, 49 und 50 im Komplex mit Thrombin wurden in Zusammenarbeit mit Tobias Brandt gelöst und zusammen mit den dazugehörigen thermodynamischen Daten in seiner Diplomarbeit diskutiert [85]. Hier werden auch die Affinitäten dieser Inhibitoren zur verwandten Serinprotease Trypsin besprochen und anhand von Kristallstrukturen und thermodynamischen Daten erklärt.

Compound	MW	PDB-Code	K _i (Thrombin)	±SD	ΔG^0 (from K _i)	ΔG^0 (from ITC)	±SD	ΔH^0	±SD	$-T\Delta S^0$	±SD
	g/mol		μM		kJ/mol	kJ/mol		kJ/mol		kJ/mol	
UB_THR_1			inactive								
UB_THR_2			inactive								
UB_THR_3			inactive								
UB_THR_4			inactive								
UB_THR_5			inactive								
UB_THR_6			inactive								
UB_THR_7			inactive								
UB_THR_8			inactive								
UB_THR_9			inactive								
UB_THR_10	444,4	3BIU	0,386	0,124	-36,6	-35,4	0,6	-16,9	0,6	-18,5	0,6
UB_THR_11	458,5	3BIV	0,363	0,171	-36,8	-36,2	0,6	-10,5	0,3	-25,7	0,4
UB_THR_12	472,5	2ZHW	0,400	0,111	-36,5	-36,3	1,4	-7,8	0,4	-28,5	1,8
UB_THR_13	486,5	2ZHE	0,281	0,102	-37,4	-37,3	0,4	-18,5	0,3	-18,9	0,1
UB_THR_14	308,8		322,6	190,5	-19,9						
UB_THR_15	322,8		155,0	86,0	-21,7						
UB_THR_16	336,9		109,4	46,3	-22,6						
UB_THR_17	370,9		94,30	34,30	-23,0						
UB_THR_18	447,0		17,00	10,40	-27,2						
UB_THR_19	360,3	2ZFP	6,810	1,600	-29,5	-31,3	1,9	-33,5	0,3	2,2	1,9
UB_THR_20	374,3		2,538	0,660	-31,9						
UB_THR_21	388,3	2ZGB	0,536	0,192	-35,8	-35,1	0,3	-42,7	2,9	7,5	3
UB_THR_22	422,4	2ZC9	0,179	0,148	-38,5	-35,4	0,2	-37,1	1,1	1,7	0,3
UB_THR_23	498,4	3DHK	0,047	0,027	-41,8	-39,6	0,2	-45,6	1,4	6,0	1,6

Compound	MW	PDB-Code	K_i (Thrombin)	$\pm SD$	ΔG^0 (from K_i)	ΔG^0 (from ITC)	$\pm SD$	ΔH^0	$\pm SD$	$-T\Delta S^0$	$\pm SD$
	g/mol		μM		kJ/mol	kJ/mol		kJ/mol		kJ/mol	
UB_THR_24	352,9	2ZI2	5,701	1,195	-29,9	-32,8	0,3	-27	1,4	-5,8	1,7
UB_THR_25	366,9		3,811	0,571	-30,9						
UB_THR_26	381,0	2ZIQ	1,281	0,272	-33,6	-37,4	1,2	-22,7	1,7	-14,7	2,9
UB_THR_27	415,0	2ZHQ	0,749	0,192	-35,0	-37,8	0,8	-28,6	0,5	-9,3	0,8
UB_THR_28	491,1										
UB_THR_29	404,3	2ZGX	0,178	0,030	-38,5	-40,1	0,2	-38,7	0,7	-1,4	0,6
UB_THR_30	418,4		0,066	0,027	-41,0						
UB_THR_31	432,4	2ZNK	0,024	0,015	-43,5	-42,9	0,2	-34,5	0,1	-8,4	0,3
UB_THR_32	466,4	2ZDA	0,004	0,001	-47,9	-46,1	0,6	-40,1	2,9	-6,1	3,4
	TRIS pH 6.0					-44,0	0,8	-34,5	0,8	-9,5	1,6
	TRIS pH 6.6					-43,1	0,3	-43,9	2,0	0,9	1,7
	TRIS pH 7.0					-44,4	0,7	-45,1	1,2	0,7	1,7
	TRIS pH 7.4					-44,3	0,8	-47,1	3,8	2,7	3,0
	TRIS pH 8.2					-44,1	0,2	-40,4	0,2	-3,7	0,4
	TRIS pH 8.6					-45,2	0,2	-41,9	1,6	-34,0	1,6
	TRIS pH 9.0					-44,4	1,1	-48,4	1,1	4,1	2,1
	Ppi pH7.8					-44,0	1,2	-44,8	0,4	0,8	1,6
	HEPES pH 7.8					-46,2		-39,1		-7,1	
	TRICIN pH 7.8					-44,5	0,6	-40,5	1,4	-4,0	2,0
UB_THR_33	542,5	2ZO3	0,0001	0,0002	-57,1	-48,5	2,0	-47,5	1,1	-0,9	1,0
UB_THR_34	456,8		0,063	0,020	-41,1	-38,4	0,2	-41,3	0,4	2,9	0,3
UB_THR_35	422,2		1,462	0,337	-33,3						
UB_THR_36	422,4		3,992	1,751	-30,8						

Compound	MW	PDB-Code	K_i (Thrombin)	$\pm SD$	ΔG^0 (from K_i)	ΔG^0 (from ITC)	$\pm SD$	ΔH^0	$\pm SD$	$-T\Delta S^0$	$\pm SD$
	g/mol		μM		kJ/mol	kJ/mol		kJ/mol		kJ/mol	
UB_THR_37	405,9	2ZDV	3,990	2,120	-30,8	-31,3	0,2	-13,1	0,9	-18,2	0,7
UB_THR_38	513,8		0,560	0,147	-35,7	-35,8	0,7	-34,5	0,4	-1,3	0,3
UB_THR_39	466,8		0,540	0,230	-35,8	-34,5	0,3	-38	1,1	3,5	0,8
UB_THR_40	452,4		0,272	0,083	-37,5						
UB_THR_41	432,9		8,697	1,884	-28,9						
UB_THR_42	436,4		0,259	0,090	-37,6	-37,2	0,5	-33,5	1,7	-3,7	2,2
UB_THR_43	364,9		216,24	78,08	-20,9						
UB_THR_44	378,9		96,15	18,79	-22,9						
UB_THR_45	372,5	2ZDQ	0,764	0,062	-34,9	-38,2	0,8	-23,9	1,3	14,2	2,1
UB_THR_46	386,5	2ZFR	0,786	0,130	-34,8	-37,5	1,1	-24,9	1,1	-12,6	2,0
UB_THR_47	362,9		92,96	11,03	-23,0						
UB_THR_48	376,9		29,73	7,45	-25,8						
UB_THR_49	407,0	2ZHF	1,182	0,295	-33,8	-38,2	0,5	-23,1	1,2	-15,1	1,5
UB_THR_50	421,0	2ZG0	1,167	0,411	-33,9	-38,4	0,8	-17,5	0,2	-20,9	1,0
UB_THR_51	401,9	2ZF0	1,207	0,671	-33,8	-34,8	0,6	-28,5	0,7	-6,3	1,1
UB_THR_52	416,0		2,777	0,171	-31,7	-34,4	0,1	-31,9	1,3	-2,5	1,3
UB_THR_53	387,9	2ZFF	11,207	6,761	-28,3	-31,7	0,3	-13,6	1,4	-18,1	1,6
UB_THR_54	417,9		4,830	0,524	-30,3						
UB_THR_55	455,9		15,09	3,28	-27,5						
UB_THR_56	348,9		72,41	22,13	-23,6						
UB_THR_57	362,9		34,49	6,34	-25,5						
UB_THR_58	280,8		1.461,9	409,3	-16,2						
UB_THR_59	336,9		481,91	139,7	-18,9						

Compound	MW	PDB-Code	K_i (Thrombin)	\pm SD	ΔG^0 (from K_i)	ΔG^0 (from ITC)	\pm SD	ΔH^0	\pm SD	$-T\Delta S^0$	\pm SD
	g/mol		μ M		kJ/mol	kJ/mol		kJ/mol		kJ/mol	
UB_THR_60	402,4		0,405	0,097	-36,5						
UB_THR_61	414,4		0,145	0,110	-39,0						
UB_THR_62	400,3		0,429	0,059	-36,3						
UB_THR_63	388,3		0,918	0,277	-34,5						
UB_THR_64	428,4	3DUX	0,101	0,039	-39,9	-38,9	0,2	-35,6	1,1	-3,4	1,3
UB_THR_65	332,2		8,083	4,218	-29,1						
UB_THR_66	440,3		0,500	0,028	-36,0	-37,3	0,3	-41,0	2,1	3,8	2,2
UB_THR_67	392,9		1,638	0,278	-33,0						
UB_THR_68	407,0		3,609	0,527	-31,1						
UB_THR_69	380,9		0,940	0,334	-34,4						
UB_THR_70	324,8		56,09	8,28	-24,3						
UB_THR_71	331,2		444,5	133,3	-19,1						
UB_THR_72	346,3		32,96	11,79	-25,6						
UB_THR_73	338,8		38,97	13,77	-25,2						
UB_THR_74	390,3		1,417	0,243	-33,4						
UB_THR_75	432,4		0,148	0,019	-39,0						
UB_THR_76	446,4		0,011	0,002	-45,5						
UB_THR_77	458,4		0,023	0,006	-43,7						
UB_THR_78	401,9		0,433	0,206	-36,3						
UB_THR_79	367,4		0,491	0,350	-36,0						
UB_THR_80	381,5		34,55	15,36	-25,5						
UB_THR_81	381,5		75,77	36,85	-23,5						
UB_THR_82	366,5		14,73	1,95	-27,6						

Compound	MW	PDB-Code	K_i (Thrombin)	\pm SD	ΔG^0 (from K_i)	ΔG^0 (from ITC)	\pm SD	ΔH^0	\pm SD	$-T\Delta S^0$	\pm SD
	g/mol		μ M		kJ/mol	kJ/mol		kJ/mol		kJ/mol	
UB_THR_83	372,5		7,60	1,35	-29,2						
UB_THR_84	379,2		5,17	0,96	-30,2	-32,9	0,5	-16,5	0,9	-16,4	0,4
UB_THR_85	393,2		184,9	68,7	-21,3						
UB_THR_86	407,3		≥ 1000								
UB_THR_87	337,8		634,7	138,9	-18,3						
UB_THR_88	351,8		330,9		-19,9						
UB_THR_89	393,9		88,50	35,96	-23,1						
UB_THR_90	405,9		24,18	5,26	-26,4						
UB_THR_91	434,0	3F68	8,739	0,990	-28,9	-32,6	0,3	-29,0	3,3	-3,6	3,0
UB_THR_92	227,7		403,5	13,1	-19,4						
UB_THR_93	226,7		155,8	3,5	-21,7						
UB_THR_94	347,3		353,9		-19,7						
UB_THR_95	472,0		0,140	0,089	-39,1						
UB_THR_96	508,0		0,020	0,005	-43,9						

2.2.1 Beurteilung der Datenqualität

Ziel der Arbeit war ein qualitativ hochwertiger Datensatz für die Bindungsaffinität der Inhibitorenserie UB_THR sowie für die thermodynamischen Einzelbeiträge.

Zur Einschätzung der Präzision der Messdaten wurden die Experimente mindestens dreifach durchgeführt und die statistische Standardabweichung ermittelt.

Dabei wurden insbesondere die kinetischen Hemmkonstanten bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von Inhibitor und Protein bestimmt, es wurden bis zu 8 Messwerte ermittelt. Da diese Messergebnisse eine Variation in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration aufwiesen, wurde zu Lasten der Präzision (hohe Standardabweichung) über alle aus linearen Dixon-Plots erhaltenen Werte gemittelt. Durch dieses (in vielen anderen Publikationen nicht übliche) Verfahren sollte der Schwerpunkt bei der Auswertung auf die Richtigkeit der Daten gesetzt werden.

Die für die Untersuchungen zur Kooperativität (Kapitel 2.6) verwendeten Daten wurden zur direkten Vergleichbarkeit neben den ohnehin standardisierten Bedingungen an einem einzelnen Messtag mit der gleichen Charge Thrombin ermittelt. Somit ist für diese im Detail ausgewerteten Hemmkonstanten eine höchste Datenqualität gewährleistet, die einen direkten Vergleich erlaubt.

Ein weiterer Indikator für die Zuverlässigkeit der kinetischen Hemmkonstanten ist die gute Übereinstimmung mit zuvor publizierten Werten für die Inhibitoren UB_THR_22 und 23 [26] sowie UB_THR_32 [29].

Weiterhin kann die Richtigkeit der Daten durch eine gegenseitige Validierung der Messmethoden nachgewiesen werden. Die freie Bindungsenthalpie ΔG^0 wurde jeweils voneinander unabhängig einerseits aus den kinetischen Messungen (berechnet aus K_i) und zum anderen aus mikrokalorimetrischen Messungen bestimmt. Da beide Werte den gleichen Bindungsprozess beschreiben, sollten sich die Resultate weitgehend entsprechen. Dies ist jedoch beim Vergleich einzelner Datenpaare selbst bei Toleranz in Höhe der Standardabweichung nicht der Fall.

Grund dafür ist, dass neben dem statischen Fehler noch ein schwer abzuschätzender aber unvermeidbarer systematischer Fehler auftritt. Weiterhin sind die Unterschiede in den Messmethoden gravierend. Es wird zwar bei den kinetischen Messungen theoretisch der Effekt der Substratverdrängung durch die Auswertung als Dixon-Plot eliminiert, in dem auf die Substratkonzentration Null extrapoliert wird. Dennoch bestehen zwischen den Bedingungen und Konzentrationsverhältnissen auf der Mikrotiterplatte und im Mikrokalorimeter Unterschiede, die sich aus der großen Verschiedenartigkeit der Meßmethoden ergeben.

In **Abbildung 24** Korrelation der mikrokalorimetrisch gemessenen Freien Energie und der aus der kinetischen Hemmkonstante K_i berechneten Freien Energie gezeigt. Es ergibt sich eine zufriedenstellende Korrelation beider Größen über den gesamten Datensatz.

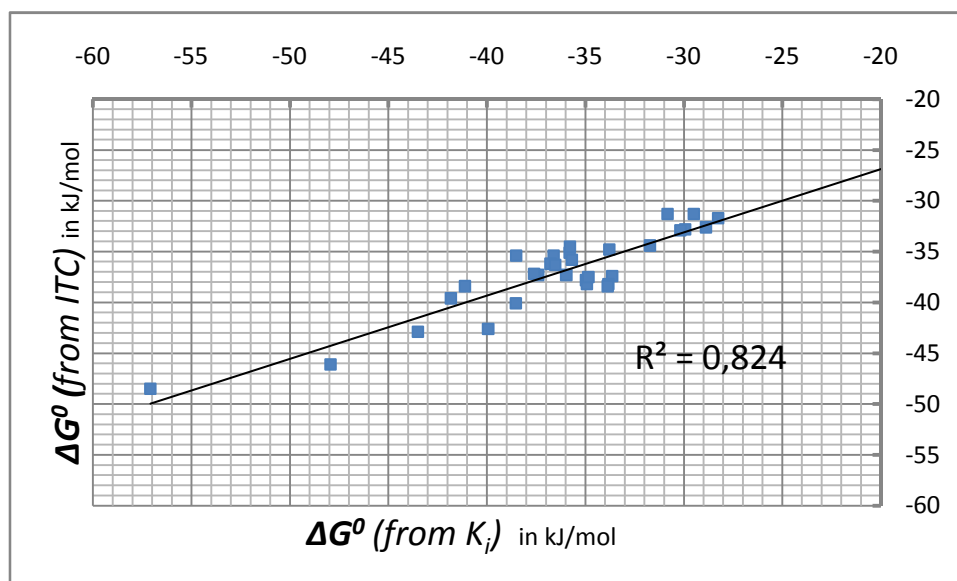


Abbildung 24 Korrelation der mikrokalorimetrisch gemessenen Freien Energie und der aus der kinetischen Hemmkonstante K_i berechneten Freien Energie

Über den gesamten Bereich der gemessenen freien Enthalpien bestätigen sich also die kinetisch gemessenen Hemmkonstanten und die ITC-Daten gegenseitig, was einen weiteren Anhaltspunkt für deren Richtigkeit und somit eine hohe Datenqualität darstellt.

2.3 Diskussion von Enthalpie-Entropie-Kompensation

Wie in Kapitel 1.5.3 beschrieben, ist es Gegenstand der Diskussion, ob das Phänomen der Enthalpie-Entropie-Kompensation bei nichtkovalenten Wechselwirkungen einem linearen Zusammenhang folgt [86], oder ob es einen Grenzwert für den durch die Bindung an das Protein verursachten Entropieverlust gibt [24].

Trägt man für die untersuchte Inhibitorserie UB_THR den mikrokalorimetrisch bestimmten entropischen Bindungsanteil $-\Delta S^0$ gegen die gemessene Bindungsenthalpie ΔH^0 auf, so ergibt sich das folgende Bild (Abbildung 25).

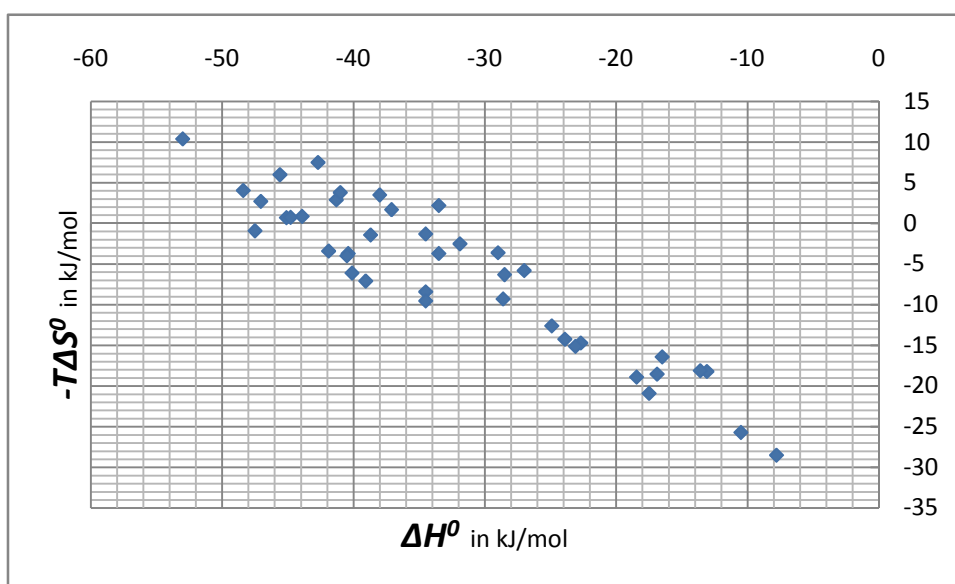


Abbildung 25 Auftragung der mikrokalorimetrisch gemessenen Enthalpie ΔH^0 und dem berechneten entropischen Bindungsanteil $-T\Delta S^0$

Der Zusammenhang zwischen beiden Größen erscheint zunächst linear über den gesamten Bereich. Dennoch kann aus dem Datensatz nicht sicher auf eine lineare Beziehung ohne Grenzwert geschlossen werden. Grund dafür ist die Tatsache, dass beide Messwerte nicht unabhängig voneinander bestimmt wurden. Bei der ITC werden die Bindungsenthalpie ΔH^0 und die freie Enthalpie ΔG^0 direkt aus *einer* Bindungsisothermen bestimmt. Der entropische Bindungsbeitrag $-T\Delta S^0$ wird anschließend aus *beiden* Größen nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung ($\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$) *berechnet* und ist somit keine Messgröße. Eine Korrelation beider Größen ergibt sich daher schon aus der Tatsache, dass eine aus der anderen durch eine Subtraktion berechnet wird.

Um sicher auf einen linearen Zusammenhang für den untersuchten Datensatz schließen zu können, wäre es nötig, den entropischen Bindungsanteil $-T\Delta S^0$ durch eine andere Methode zu bestimmen. Dies ist experimentell jedoch nicht einfach möglich und auch theoretische Berechnungen mit Hilfe der strukturellen Information können diesen Wert nicht mit der nötigen Präzision und Richtigkeit liefern.

2.4 More than a simple lipophilic contact: A detailed thermodynamic analysis of nonbasic residues in the S1-pocket of Thrombin

Abstract

The field of medicinal chemistry aims to design and optimize small molecule leads into drug candidates that may positively interfere with pathological disease situations in humans or combat the growth of infective pathogens. From the plethora of crystal structures of protein-inhibitor complexes we have learned *how* molecules recognize each other geometrically, but we still have rather superficial understanding *why* they bind to each other. This contribution surveys a series of 26 thrombin inhibitors with small systematic structural differences to elucidate the rational for their widely deviating binding affinity from 185 μM to 4 nM as recorded by enzyme kinetic measurements. Five well-resolved (resolution 2.30 - 1.47 Å) crystal structures of thrombin-inhibitor complexes and an *apo*-structure of the uncomplexed enzyme (1.50 Å) are correlated with thermodynamic data recorded by isothermal titration calorimetry with twelve selected inhibitors from the series. Taking solubility data into account, the variation in physicochemical properties allows conclusions about the relative importance of the enthalpic binding features as well as to estimate the importance of the parameters more difficult to capture such as residual ligand entropy and desolvation properties. The collected data reveal a comprehensive picture of the thermodynamic signature that explains the so far poorly understood attractive force experienced by *m*-chloro-benzylamides to thrombin.

Introduction

Nearly two decades of drug research on small molecules inhibiting the serine protease thrombin, an established target for the prevention of cardiovascular diseases, has revealed a plethora of highly potent drug candidates.[74] Most of the early development programs followed successfully a strategy to address the enzyme's S1 specificity pocket with basic molecular moieties to mimick the arginine sidechain of the natural substrate Fibrinopeptide A.[87] However, as a consequence of being positively charged under physiological conditions, they generally have poor pharmacokinetic properties. In order to address this deficiency, sophisticated prodrug strategies have been developed to achieve sufficient bioavailability.[77] Ongoing efforts to produce therapeutically useful orally available thrombin inhibitors[88] resulted in the discovery of the uncharged *m*-chloro-benzylamides as promising alternatives to the prodrug strategy. They are assumed to form a lipophilic contact in the S1 pocket[26, 89-91], which has the polar carboxylate group of Asp189 at its far end. Therefore

the rationalization put forward[26, 89-91] to explain the pronounced binding affinities of the *m*-chloro derivatives as predominantly hydrophobic binding appears unsatisfactory. Detailed investigations with respect to the binding thermodynamics of these extremely promising ligands to elucidate their binding characteristics are described in the present contribution.

We present a detailed study on a congeneric series of thrombin inhibitors, including X-ray crystallography and isothermal titration calorimetry, to find possible explanations for these so far poorly understood structure-activity relationships.

An electrostatic attractive force resulting from a polarized chlorine atom above a tyrosine π -system has recently been demonstrated for chloro-aromatic inhibitors addressing the structural related S1-pocket of coagulation factor Xa.[92-96] An analysis of crystal structures from the PDB along with ab-initio calculations showed the Cl- π interaction as a clearly attractive force, which was assigned to the dispersion force as major source of attraction.[97] A better understanding of the electrostatic component of this interaction may also make medicinal chemists more aware of the possible nature of such interactions and the transfer of this knowledge to other related and ongoing drug design projects. The astonishingly high ligand efficiency of triclosane to its molecular target FabI[98-101], a ligand that intuitively contradicts our keen sense for an optimal lead compound, reemphasizes the necessity to better understand the driving forces of chloro-aromatic interactions in protein-ligand complex formation.

The characterization of the determinants for molecular recognition of small molecules by a macromolecular target is an essential requirement for any drug development project that intends to start from rational grounds.[102] Whereas the foundation of these mostly non-covalent interactions is reasonably well understood, it is still a major challenge to obtain detailed knowledge about the individual thermodynamic parameters and their respective contributions to binding affinity. Nevertheless, studies providing this detailed information would allow us to predict more precisely ligand binding affinity as a prerequisite for successful *in silico* screening.^[6, 10, 11]

The interplay of intra- and intermolecular forces between ligand, receptor and solute makes the binding event a process of challenging thermodynamic complexity. A promising approach to unravelling this complexity is to perform systematic studies on interacting molecules differing by only minor alterations.[103] Few systematic studies are available[46, 104, 105], and they often demonstrate paradoxical or unexpected results.[106] They also emphasize that entropy can significantly affect the Gibbs free energy of binding, and that entropy is notoriously difficult to predict.[107] If only the overall binding affinity, as determined by a typical bio-assay, is taken into account the danger exists that a superficial and oversimplified interpretation of binding energetics will be made.[84] Consequently, multiple biophysical methods should be utilized in order to clarify the energetics of the ligand binding process in greater depth.

The serine protease thrombin[108] is an ideal model system for performing fundamental studies aimed at providing a better understanding of the energetics of the ligand-protein binding process because its active site is composed of a set of distinct, well-defined, binding pockets that can be easily addressed.[109] Crystallography can be performed routinely and the large quantities of enzyme necessary for ITC are available. Furthermore, thrombin is a target familiar to many researchers in the enzyme inhibitor field and therefore using it as a model system facilitates an appreciation of the information obtained as well as its application to other enzyme systems.

In the present paper, we present a “thermodynamic mapping” of a series of D-Phe-Pro-based thrombin inhibitors (**Figure 26**), that differ only in the portion binding to the S1 pocket.

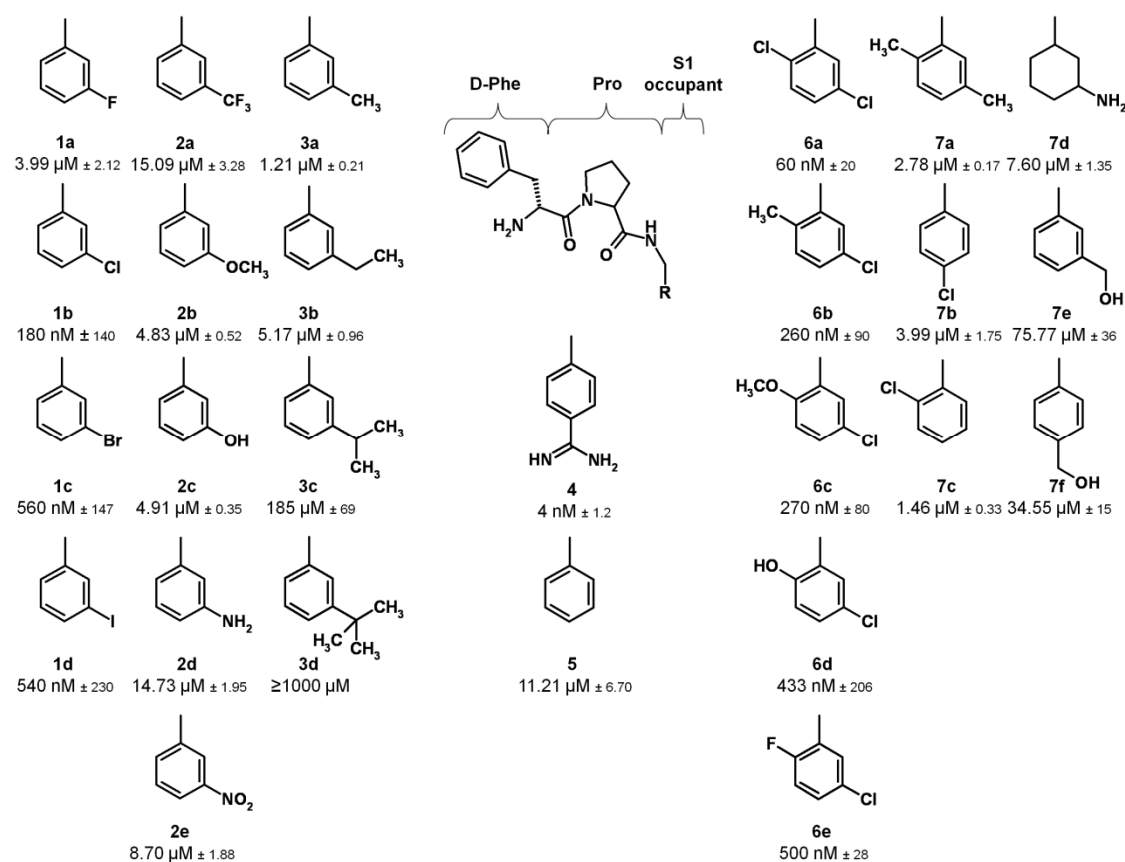


Figure 26 Chemical formulae of the inhibitors discussed in this study. Inhibitory potency towards human thrombin is given as kinetic inhibition constant K_i with the standard deviation from averaging of at least three measurements. Curly brackets indicate the three parts of each molecule for which B -factors from crystal structures were evaluated separately.

This ligand series allows us to follow changes in enthalpic and entropic contributions to the Gibbs free energy of binding in a stepwise fashion. A series of 26 ligands has been synthesized and their binding affinities towards human thrombin were first determined in a kinetic assay. For twelve of the most interesting compounds, the Gibbs free energy of binding ΔG^0

could be factorized by ITC into an enthalpic ΔH^0 and entropic contribution $-T\Delta S^0$. As a reference state for thrombin prior to the binding event, a crystal structure of the uncomplexed enzyme was determined, showing an extended hydration pattern of the active site. Five inhibitors with wide ranging binding affinity, even though they are structurally very similar, have been investigated by X-ray crystallography. Their binding modes elucidate the interaction pattern and hydration in the S1 specificity pocket and allow conclusions about residual ligand mobility in light of their relative differences in the temperature factors.

When combined with solubility and desolvation energy considerations, the data provide a more complete analysis of the driving forces for inhibitor binding, in which unexpected electrostatic attraction and residual entropy play important roles.

Results and Discussion

Analysis of crystal structures

X-ray crystallography of uncomplexed thrombin resulted in a structure with the active site of the enzyme in its hydrated state (**Figure 28a**). Eight structural water molecules could be assigned to peaks in the difference electron density for the region that is usually occupied by the inhibitor series under consideration. The assignment of these waters during refinement was made on the basis of the initial difference electron density and on expedient temperature factors. Although the complete solution hydration pattern is not fully presented by the crystallographically observed hydration water molecules, the eight observed water molecules within the inhibitor binding cavity provide a reasonable approximation of the putative hydrogen bonding network that has to be disrupted upon inhibitor binding.

Furthermore, the *apo*-structure provides insights into the effects of inhibitor binding on the conformation of the active site's amino acids. The major structurally observable difference between the uncomplexed enzyme and the inhibitor bounded state is that the side chain of Leu 99 at the side wall of the S3 pocket could be refined in a double conformation when none of the ligands in the present study was occupying this pocket. This indicates a higher degree of thermal motion for this amino acid, relative to the others, in the uncomplexed hydrophobic pocket, which becomes restricted to one conformation upon inhibitor binding. As the loss of rotational degrees of freedom for Leu 99 in the S3 pocket is the same for all inhibitors discussed in this publication, its effect on the relative differences of the thermodynamics of binding can be neglected in the direct comparison of the inhibitors.

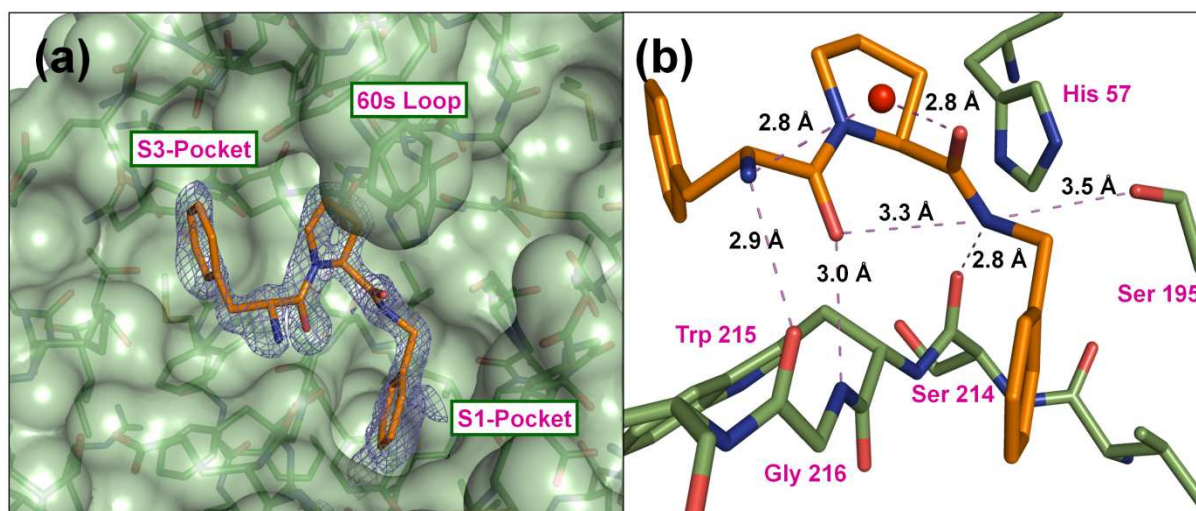


Figure 27 Inhibitor **5** in complex with human thrombin inhibited at the exosite by hirugen. **(a)** View on active site with solvent accessible surface of thrombin, heavy chain in pale green and inhibitor in orange, heteroatoms color-coded. The $F_o - F_c$ difference electron density for **5** is depicted in blue at 1.5σ . **(b)** Active site residues are represented by green sticks, ligand **5** is shown in orange. The red sphere represents the water molecule being involved in a hydrogen-bonding network. Hydrogen bonds are indicated as broken lines in magenta.

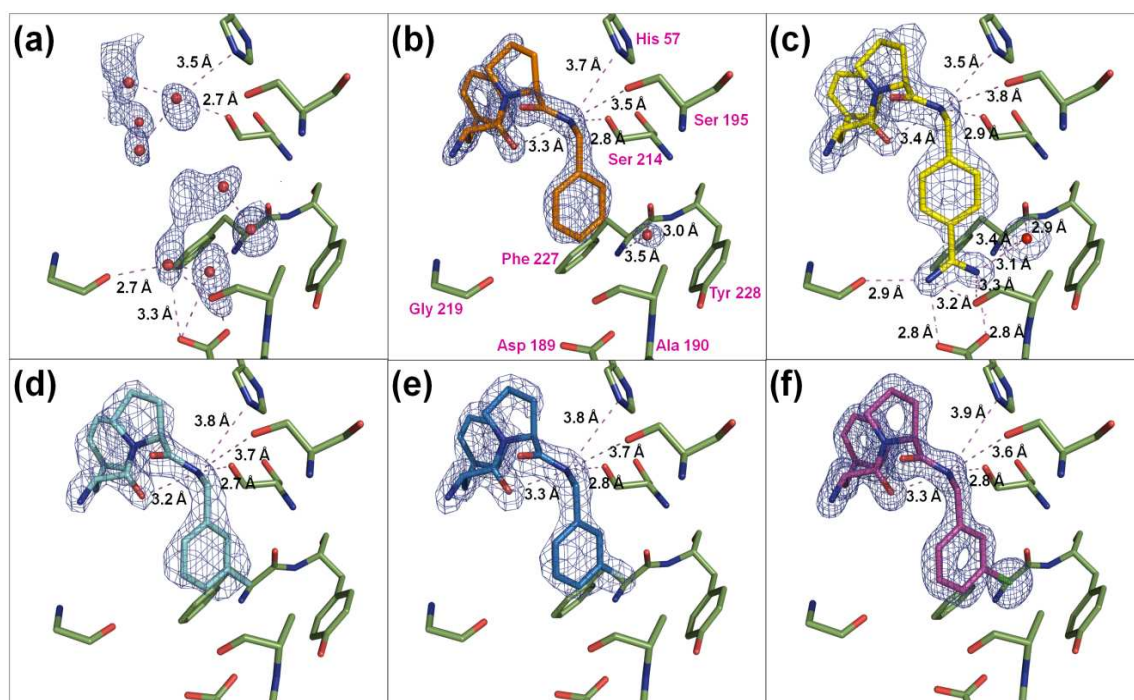


Figure 28 View on the S1-specificity pocket of the uncomplexed enzyme **(a)** and with bound inhibitors **4** **(c)**, **3a** **(d)** and **1b** **(f)**, **1a** **(e)** and **5** **(b)**. The $F_o - F_c$ difference electron density for all ligands and water in the pocket is depicted in blue at 2σ . Important distances to residues of the binding pocket are indicated as magenta broken lines.

The crystal structures of inhibitors **1a**, **1b**, **3a**, **4** and **5** in complex with human thrombin show virtually the same binding mode for the D-Phe-Pro portion of the ligands (**Figure 27a**). The phenyl ring occupies the hydrophobic S3 pocket, whereas the proline moiety fits perfectly well beneath Tyr 60A and Trp 60D of the 60-loop, as was analogously observed for a valine side chain in the natural substrate.[28] The central region of the ligands are involved in an elaborate hydrogen-bonding network with the backbone of the enzyme, along with a captured structural water molecule (**Figure 27b**). All of the ligands form a β -sheet like interaction with the backbone residues 214 to 216 of the protein, as was also observed for the natural substrate.[28] The terminal primary amine and the adjacent carbonyl form hydrogen bonds with distances of 2.7 – 3.1 Å to the corresponding functionalities of Gly 216. Due to the highly conserved interaction pattern for the common D-Phe-Pro portion of the ligands in this study, any differences in their binding energetics can be confidently attributed to differences in their respective side chains binding in the S1 pocket.

The interaction pattern experienced inside the S1 pocket differs among the investigated inhibitors (**Figure 28**). The benzamidine **4** binds tightest with a K_i of 4 nM. It forms an almost symmetric salt-bridge to Asp 189 at the bottom of the pocket. Simultaneously, a water molecule is locked in the pocket in exactly the same position as was found in the uncomplexed state, and is mediating a hydrogen bonding from the ligand amidino group to the backbone of Phe 227 (**Figure 28** View on the S1-specificity pocket of the uncomplexed enzyme (**a**) and with bound inhibitors **4** (**c**), **3a** (**d**) and **1b** (**f**), **1a** (**e**) and **5** (**b**). The $F_o - F_c$ difference electron density for all ligands and water in the pocket is depicted in blue at 2σ . Important distances to residues of the binding pocket are indicated as magenta broken lines.). This water molecule is displaced by the *meta*-substituents CH₃, F and Cl of the benzylamides **3a**, **1b** and **1a** (**Figure 28d-f**). The orientation of the terminal phenyl moiety with respect to Tyr 228 results in a rotation of 33.4° compared to the phenyl ring orientation of **4**. The unsubstituted inhibitor **5**, even though it lacks the *meta*-substituent, adopts the same ring orientation (**Figure 28b**). Furthermore, a water molecule returns back into the complex. It is located at the same position as in the uncomplexed S1 binding pocket and in the benzamidine complex (**Figure 28 a+c**), albeit the water molecule exhibits in this case a much higher temperature factor accompanying inhibitor **5**. The location within the S1 pocket seems optimal for accommodating a water molecule, because it is able to form multiple hydrogen bonds with the protein at this site.

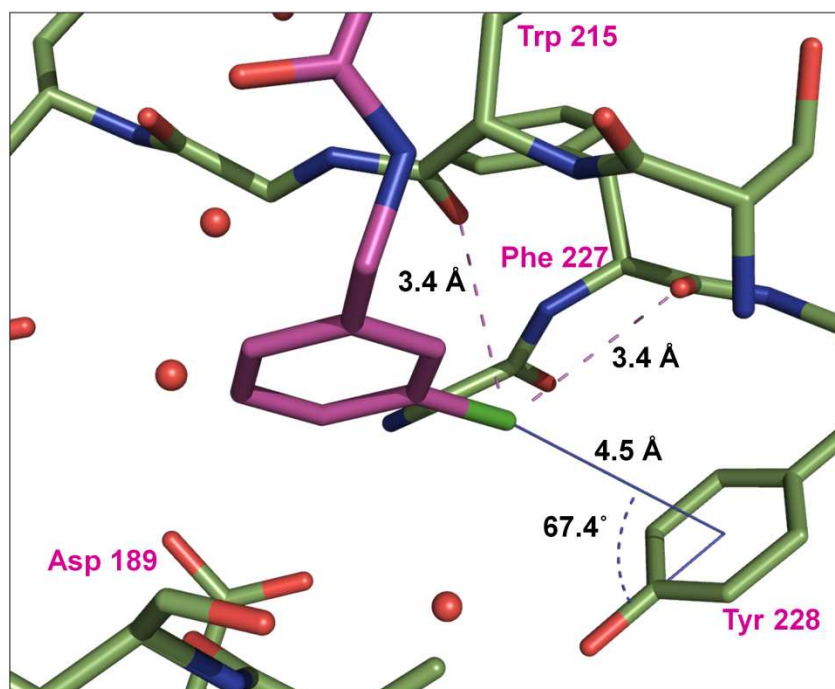


Figure 29 Enlarged view on the local environment of the chlorine atom of inhibitor **1b**. The inhibitor is colored in magenta, protein residues in green, heteroatoms color-coded. Interactions are indicated by dashed lines, the chlorine- π interaction as solid line in blue.

Interestingly, the chlorine atom of **1b** is located very close (3.4 Å) to the carbonyl groups of Phe 227 and Trp 215 (**Figure 28f**, **Figure 29**). Furthermore, the center of the chlorine atom is located 4.5 Å above the centroid of Tyr 228. With this centroid it forms an angle of 67.4° with respect to the plane through the phenolic ring. This geometry resembles the preferred orientation, frequently observed for chlorine atoms pointing towards aromatic ring systems in a large dataset of small molecule crystal structures in the Cambridge Structural Database[110]. In terms of a recent evaluation of chlorine- π interactions in protein-ligand complexes[97], this orientation is characterized as the “edge on”-geometry.

To obtain qualitative information about the residual mobility in the protein-ligand complex, special attention has been directed towards the crystallographically observed temperature factors. As their values correlate significantly with the observed population parameters assigned to the hosted ligands, however some special care is needed in the interpretation. We analyzed the *B*-factors separately for each inhibitor relative to the neighboring amino acids exposed to the binding site. This calibration was performed as an approximate normalization to correct for any superimposed quality difference in the diffraction properties of the crystals (**Table 1**).

Table 1 Binding data ΔG^0 , ΔH^0 and $-\Delta S^0$ (in kJ/mol) of inhibitors as determined by ITC, sorted by ΔG^0 , and evaluation of B -factors (in Å²) based on the corresponding crystal structures. Amino acids of the binding pocket (distance 3 Å from inhibitor): His57, Tyr60A, Pro60C, Trp60D, Glu97A, Asn98, Leu99, Asp102, Ile174, Asp189, Ala190, Cys191, Asp194, Ser195, Val213, Ser214, Trp215, Gly216, Glu217, Gly219, Cys220, Gly226, Phe227, Tyr228. Errors indicate standard deviation from at least duplicate measurements.

Inhib.	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	$-\Delta S^0$ (kJ/mol)	B Inhib.	B binding site	B Inhib. / B binding site	B D-Phe	B Pro	B D-Phe + Pro	B S1 occu- pant	B S1 occupant / B Pro	B S1 occupant / B D-Phe + Pro
4	-46.1 ± 0.6	-40.1 ± 2.9	-6.1 ± 3.4	11.4	10.9	1.06	12.3	11.6	11.9	10.5	0.91	0.88
6a	-38.4 ± 0.2	-41.3 ± 0.4	2.9 ± 0.3									
6e	-37.3 ± 0.3	-41.0 ± 2.1	3.8 ± 2.2									
6b	-37.2 ± 0.5	-33.5 ± 1.7	-3.7 ± 2.2									
1c	-35.8 ± 0.7	-34.5 ± 0.4	-1.3 ± 0.3									
1b	-35.4 ± 0.8	-37.1 ± 1.1	1.7 ± 0.3	15.7	14.5	1.08	16.6	15.7	16.1	14.5	0.92	0.90
3a	-34.8 ± 0.6	-28.5 ± 0.7	-6.3 ± 1.1	15.2	14.2	1.06	17.0	17.1	17.1	10.6	0.62	0.62
1d	-34.5 ± 0.3	-38.0 ± 1.1	3.5 ± 0.8									
7a	-34.4 ± 0.1	-31.9 ± 1.3	-2.5 ± 1.3									
1a	-31.3 ± 0.2	-13.1 ± 0.9	-18.2 ± 0.7	18.8	14.5	1.30	17.3	18.0	17.7	21.3	1.18	1.20
3b	-32.9 ± 0.5	-16.5 ± 0.9	-16.4 ± 0.4									
5	-31.7 ± 0.3	-13.6 ± 1.4	-18.1 ± 1.6	26.2	18.9	1.39	26.2	24.9	25.5	28.2	1.13	1.11

For **1b**, **3a** and **4**, the ratio of *B*-factors of ligand relative to the binding pocket residues is close to 1. This suggests equal thermal motion of the ligand and the binding cavity and full occupancy of the inhibitors in the crystal.

This ratio increases significantly to 1.30 and 1.39 for inhibitors **1a** and **5**, respectively. One possible explanation for the enhanced *B*-factors of the ligands relative to the binding cavity is incomplete ligand occupancy. A second possible explanation is higher residual mobility of these ligands within the binding cavity due to a less firm arrest inside the S1 specificity pocket.

In order to avoid an unreasonable interpretation of occupancy differences of the inhibitors in the different crystal structures, the *B*-factors were compared in an alternative way. Each molecule was divided into the D-Phe, Pro and S1-occupant portion (**Figure 26**) and the *B*-factors of these portions were evaluated separately. As only ligand portions are mutually compared, this comparison will not be affected by possible occupancy differences. The *B*-factors for the ligand atoms bound in the S1-pocket were compared to the D-Phe-Pro moiety of the molecule or to the Pro part alone (**Table 1**). Again, this ratio is lower and closer to 1 for **1b**, **3a** and **4**, indicating a more firm arrest of these ligands inside the S1 pocket. In contrast, for **1a** and **5**, the ligand portion inside the S1 pocket shows much higher *B*-factors than the remaining part of the molecule. Thus, ratios larger than 1 are observed. Combining both methods for evaluating the *B*-factors, and considering the fact that **1a** and **5** have smaller P1 side chains than **1b**, **3a** and **4**, the conclusion can be made that the fluoro- and unsubstituted P1 side chains result in greater residual mobility for the ligand while bound in the thrombin active site.

Factorization into enthalpic and entropic contributions by Isothermal Titration Calorimetry

In order to factorize the Gibbs free energy of binding ΔG^0 , the standard binding enthalpy ΔH^0_{bind} and the dissociation constant K_D were determined by ITC for twelve inhibitors. The entropic contribution to binding $-T\Delta S^0$ has been calculated as difference between ΔG^0 (derived from K_D) and ΔH^0_{bind} according to the Gibbs-Helmholz equation. The results are listed in **Table 1**. Despite their close similarity, the inhibitors show a large variation in the free energy of binding to thrombin, between -46 kJ/mol for the benzamidine **4** and -32 kJ/mol for the unsubstituted benzylamide **5**. As a general trend, the more potent inhibitors also experience a larger enthalpic contribution to binding. It is particularly noteworthy, that the benzylamides **1b-d**, substituted by a chlorine, bromine or iodine atom in *meta* position, have a binding enthalpy almost as large as the salt-bridge forming benzamidine **4**. This enthalpic effect is even larger for the *m-chloro*-benzylamides **6a** and **6e**, which have a second halogen atom at the opposing *para*-position of the phenyl ring.

A significant drop in ΔH^0_{bind} is observed for **1a**, **3b** and **5**. Since thrombin accommodates the larger halogens, Br and I, without a significant drop in the ΔH^0_{bind} , and modelling experi-

ments suggest that there is supposedly sufficient room in the S1 pocket to accommodate an ethyl group, the reduction ΔH_{bind}^0 for **3b** is unlikely to be mainly due to steric reasons. The expected identical binding modes of **1a** and **5** were confirmed by crystallography. Their weak end enthalpic interaction is, at least in part, counterbalanced by an enhanced favorable entropic contribution to binding. This enthalpy-entropy compensation is believed to be a fundamental feature of weak non-covalent interactions and it is supported by our data. Interestingly, the thermodynamic profiles of **1a** and **5** do not differ, even though the unsubstituted **5** does not displace the conserved water molecule in the S1 pocket upon binding. The fluoro derivative **1a** must maintain an unoccupied void in this region. Previous analyses of similar cases have shown[111], that capturing a water molecule upon binding is entropically unfavorable and enthalpically beneficial for binding. If the water molecule, *not* displaced in the case of the binding of **5** to thrombin, superimposes an unfavorable entropic and beneficial enthalpic contribution, the thermodynamic signature of the latter ligand should be even more enthalpically driven and entropically disfavored compared to **1a**. Most likely, several mutually compensating effects result in a virtually identical profile for the unsubstituted and fluoro derivative.

Figure 30 shows that for all twelve inhibitors the free energy of binding ΔG^0 , as determined by ITC, exhibits a good correlation with the free energy for the binding event that can be derived from the inhibition constant ($\Delta G = -RT \ln K_i$), as determined by the kinetic enzyme assay. Both methods to determine binding affinity substantially affirm each other, although the underlying principles and experimental conditions (e.g. displacement of the chromogenic substrate in case of K_i) differ remarkably.

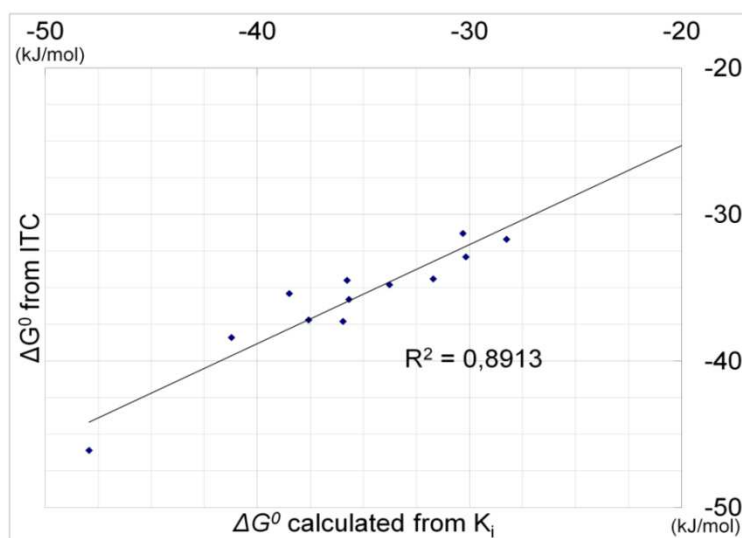


Figure 30 Correlation between Gibbs free energies of binding ΔG as determined by ITC and as calculated from the kinetically determined K_i ($\Delta G = -RT \ln K_i$).

Considerations with respect to differing desolvation energies.

The binding affinity for the formation of a protein-inhibitor complex is strongly dependent on the desolvation energy that is required to desolvate polar groups of the interacting partners.[49] As very similar areas of the protein are buried upon ligand binding for the thrombin inhibitors studied herein, we assume a constant contribution for the protein, whereas the desolvation energy of the inhibitors relates mainly to their solvation enthalpy in water. As the investigated inhibitors differ only in the substitution pattern at the phenyl ring occupying the S1-specificity pocket, a crude approximation roughly correlating with the expected desolvation free energy can be attempted by considering the experimentally determined water solubilities of corresponding benzene derivatives (**Table 2**).[112-114]

Table 2 Aqueous molar solubilities of benzene derivatives as determined by *Yalkowsky et al.*, given on logarithmic scale

Derivate	log Solubility
1,4 Dichlorobenzene	-3.21
Iodobenzene	-2,87
Bromobenzene	-2.39
Chlorobenzene	-2.26
Toluene	-2.24
Fluorobenzene	-1.79
Benzene	-1.66
Phenol	- 0.08

These data show that substitution of the benzene ring with groups such as F, Cl, Br, I or methyl, is detrimental to water solubility. In contrast, the polar phenolic hydroxyl group enhances solubility significantly. Interestingly, substitution of benzene with a halogen atom leads to a significant decrease in solubility – and thus a likely decrease in desolvation energy - except for fluorine. This finding is further supported by our subsequently performed QM/MM study[115] wherein the calculated desolvation energies of the larger halogen-containing inhibitors, **1b**, **1c**, and **1d** are significantly smaller than those for the fluorine inhibitor **1a**. The special properties of the methyl-containing inhibitor **3a** have also been investigated by QM/MM calculations and will be further addressed.[115] This behavior seems to parallel the reduced binding enthalpy of **1a** and **5** (**Table 1**), indicating that a lower desolvation energy of the portion hosted in the S1 pocket seems to provide a crucial contribution to the enthalpy of binding. The approximate correlation of the measured binding enthalpy with the desolvation free energy of the benzylamides is emphasized by the fact that the least

soluble benzene derivatives are generally the most enthalpic binders (**Table 1**). The highly soluble benzamidine derivative **4** is an exception to this observation, as its pronounced desolvation energy can easily be compensated by the enthalpically favorable charged interaction with the deprotonated Asp189 at the bottom of the S1 pocket. This derivative still shows a favorable entropic contribution to binding even though the formed salt bridge should be detrimental to the entropy of binding because it firmly holds the ligand in the S1 pocket leading to reduced residual ligand entropy. However, the overall entropic benefit may result from an entropically favorable desolvation of the positively charged amidinium group, as this highly charged group will impose a strong local ordering effect on the surrounding water molecules in the bulk phase.

Correlation of thermodynamic and structural features

The detailed information, collected for this series of inhibitors, enables us to understand their differences with respect to binding energies, at least in qualitative terms. In this discussion, we assume that thermodynamically relevant changes within the host protein are virtually identical within the series of investigated ligands, and thus cancel out in a relative comparison of the inhibitors. Similarly, we assume the dynamics of the free ligands and thus their entropy before forming a complex to be virtually constant throughout the series, at least for the unpolar substituted benzylamides.

Due to the formation of a salt-bridge with the protein, the benzamidine derivative **4** binds with high binding enthalpy overcompensating the required high desolvation energy. Even though the compound is rather firmly fixed at the binding site, it still experiences a favorable entropic contribution to binding. This may result from the desolvation of the positively charged amidinium group (see above).

A major driving force for binding of the *meta*-substituted benzylamides **1b-d**, and **6a-e** is their low desolvation energy. In the case of the *m*-chloro compounds an additional electrostatic component might be contributing to binding enthalpy. This chlorine- π attraction parallels cation- π interactions[35, 36, 116] as it was demonstrated for similar inhibitors binding to the S1-pocket of factor Xa[92] and recently discussed[97] for similar cases. Although these compounds repel a tightly bound water molecule from the bottom of the S1 pocket in the uncomplexed state, their entropic contribution to binding is low. This observation also agrees with the observation that the bound inhibitors exhibit low residual mobility in the binding pocket.

The unsubstituted inhibitor **5** and the slightly larger *m*-fluoro-substituted inhibitor **1a** both have the attribute of low binding enthalpy in common. This correlates with their comparably high desolvation energy, reemphasizing the importance of this entity, often neglected in affinity predictions. Another major difference relative to the *m*-halogen inhibitors is that both compounds lack a favorable electrostatic component to interact with the S1 binding pocket. Thus, they form a less firmly fixed complex with the protein, indicated by the en-

hanced residual mobility of the S1 portion of the ligands. Amplified residual or configurational entropy[117] can be assigned to the ligands, experiencing higher vibrational degrees of freedom in the complex. The ligand internal loss of conformational entropy upon binding is assumed to be similar for all inhibitors of the series.

Conclusions

We have presented a congeneric series of thrombin inhibitors, for which the thermodynamic driving forces of complex formation have been studied in detail. The differing thermodynamic binding profiles of closely related ligands could be explained by individual differences in their potential to interact with solvent and protein. In particular, our data accentuate the strong influence of desolvation energy attributed to the part of the inhibitors that is deeply buried in the S1 pocket.

Furthermore, the series provides deeper insights into how spatial fixation affects the entropic contribution to binding. The examples show, that in general the enthalpically optimized ligands are the most potent binders, although obviously experiencing enthalpy-entropy compensation.

Special attention has been dedicated to the enthalpically favoured accommodation of the *m*-chloro-benzylamides in the S1 specificity pocket, which we explain by a superimposed electrostatically optimal positioning of the chlorine atom above the π -electrons of Tyr 228. This interaction of a chlorine substituent with the core of an aromatic amino acid resembles the well characterized cation- π -interaction, and is often not considered by medicinal chemists as a possible strategy to gain binding affinity in ligand optimization.

Remarkably, the fluorine-substituted compound shows a very different thermodynamic signature compared to the other halogen derivatives with respect to the investigated physicochemical properties. It seems, that due to the highly polar nature of the carbon-fluorine bond, the small fluorine atom interacts more favourably with water molecules in the bulk water than with the environment provided by the S1 pocket.

We hope that this study contributes to the fundamental understanding of molecular recognition of small molecules by a macromolecule and thus helps to transform concepts in drug design from predominantly phenomenological observations to more “rational” grounds driven by an understanding of all involved phenomena.

2.5 Think twice: Understanding the high potency of bis-phenyl methane inhibitors of thrombin

Abstract

Successful design of potent and selective protein inhibitors, in terms of structure-based drug design, strongly relies on the correct understanding of the molecular features determining the ligand binding to the target protein. We present a case study of serine-protease inhibitors with a bis-phenyl methane moiety binding into the S3 pocket. These inhibitors bind with remarkable potency to the active site of thrombin, the blood coagulation factor IIa. A combination of X-ray crystallography and isothermal titration calorimetry (ITC) provides conclusive insights into the driving forces responsible for the surprisingly high potency of these inhibitors. Analysis of six well-resolved crystal structures (resolution 1.58 – 2.25 Å) along with the thermodynamic data allows an explanation of the tight binding of the bis-phenyl methane inhibitors. Interestingly, the two phenyl rings contribute to binding affinity for very different reasons - a fact that can only be elucidated by a structure-based approach. The first phenyl moiety occupies the hydrophobic S3 pocket, resulting in a mainly entropic advantage of binding. This observation is based upon the displacement of structural water molecules from the S3 pocket that are observed in complexes with inhibitors that do not bind in the S3 pocket. The same classical hydrophobic effect cannot explain the enhanced binding affinity resulting from the attachment of the second, more solvent exposed phenyl ring. For the bis-phenyl methane inhibitors, an observed adaptive rotation of a glutamate residue adjacent to the S3 binding pocket attracted our attention. The rotation of this glutamate into salt-bridging distance with a lysine moiety correlates with an enhanced enthalpic contribution to binding for these highly potent thrombin binders. This explanation for the magnitude of the attractive force is confirmed by data retrieved by a Relibase search of several thrombin-inhibitor complexes deposited in the Protein Data Base exhibiting similar molecular features. Special attention was attributed to putative changes in the protonation states of the interaction partners. For this purpose, two analogous inhibitors mainly differing in the potential to change protonation state of a hydrogen-bond donor functionality were compared. Buffer dependencies of the binding enthalpy associated with complex formation could be traced by ITC, which revealed, along with analysis of the crystal structures (resolution 1.60 and 1.75 Å), that a virtually compensating proton interchange between enzyme, inhibitor and buffer is responsible for the observed buffer independent thermodynamic signatures.

Introduction

The serine protease thrombin is an attractive target for the development of new anticoagulant drugs.[118] Consequently, many thrombin inhibitors have been tested for their inhibitory potency and a subset has been evaluated as putative drug candidates.[74] A structural comparison of the binding mode, observed for the natural substrate Fibrinopeptide A and the potent peptidic inhibitor D-Phe-Pro-Arg, gave important insights into the occupation of the active site. The D-configured phenylalanine in D-Phe-Pro-Arg bridges an extensive loop present in Fibrinopeptide A, which orients its L-Phe and L-Leu residues in position P8 and P9 into the large distal S3 recognition pocket of thrombin. In consequence, the small tripeptidic inhibitor places its D-Phe residue directly into the hydrophobic S3-pocket of the enzyme. Thus, it is assumed that the aromatic moiety of D-Phe most likely contributes to binding affinity through a classical hydrophobic effect[43, 119]. It results from an entropically favourable displacement of water molecules from the hydrophobic surface of the S3 binding pocket once the D-Phe phenyl ring occupies this pocket.

The introduction of a second phenyl ring closely adjacent to the first one in D-Phe-Pro-Arg leads to a further dramatic enhancement of binding affinity[26, 120, 121]. This pronounced effect was also observed for other sterically demanding substituents such as pyridine[121] and cyclohexane[122]. Bis-phenyl methane inhibitors without interacting with residues in the S1 pocket of thrombin have been described.[123] However, up to now, no convincing rational explanation for this pronounced affinity enhancement arising from the second attached hydrophobic moiety has been provided. This observation appears even more striking, as the hydrophobic S3 pocket of the enzyme can be optimally filled by only one aromatic occupant of the size of a phenyl ring. Hence, the further improvement due to an additional classical hydrophobic effect, achieved by a second phenyl substituent, is an unsatisfactory explanation. Consequently, the current systematic experimental study has been carried out in order to find a rationale for the previously reported[26, 120, 121] boost in inhibitory potency in the case of bis-phenyl methane ligands.

This study covers a series of six related inhibitors (**Figure 31**), for which the hydrophobic substituent that binds into the thrombin S3 pocket is increased in a stepwise fashion by adding phenyl rings to the central core structure. Two different anchoring groups are used for the S1 pocket to allow validation of the relevant changes observed in and adjacent to the S3 pocket of thrombin. Across the series, the inhibitors vary in their kinetically determined binding affinity towards thrombin from 6.8 μM to 100 pM. This enabled us to study systematically the relevant differences in the thermodynamic binding features by ITC. A rational explanation is provided by the crystallographically observed binding modes of the corresponding thrombin-inhibitor complexes and the differing thermodynamic signatures.

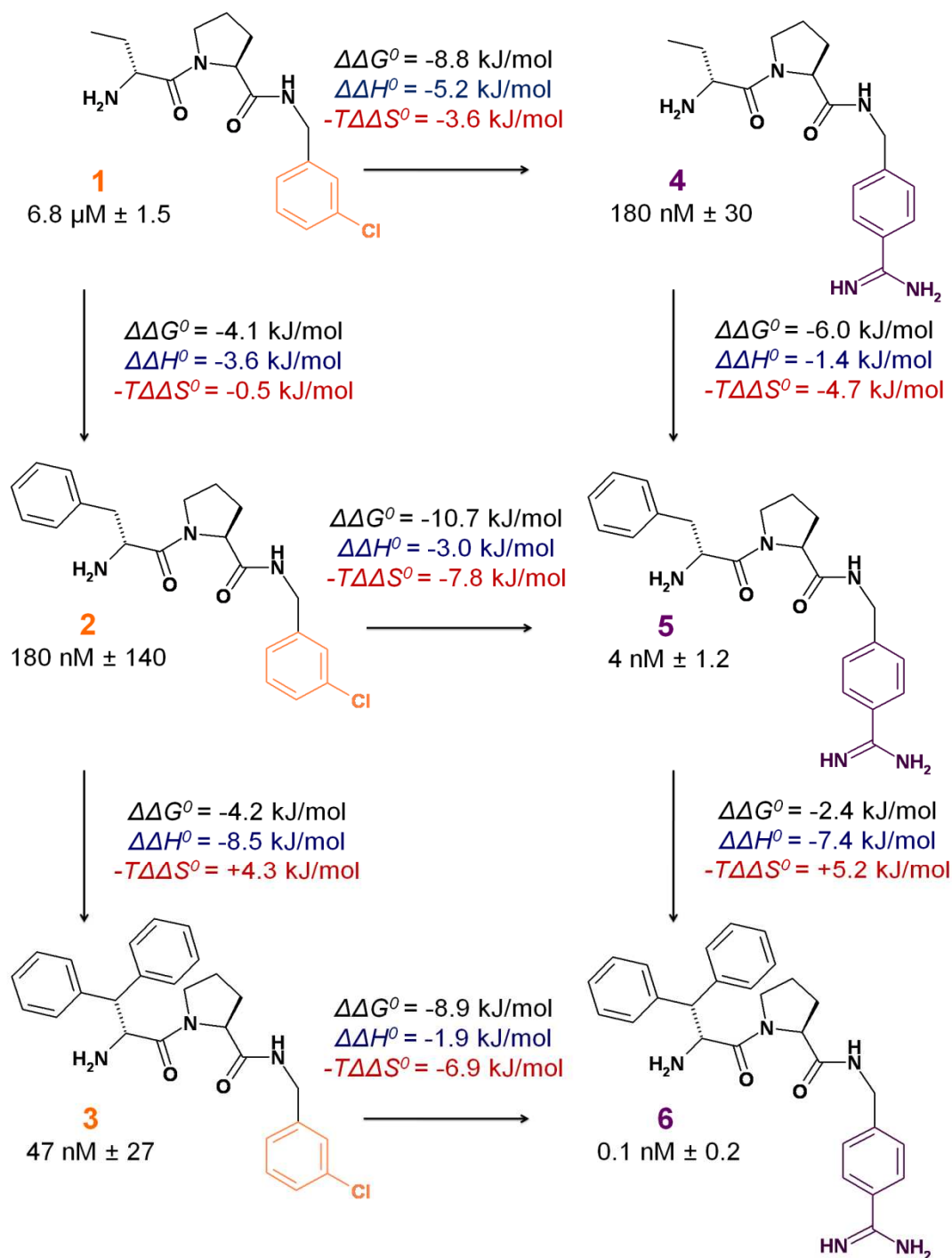


Figure 31 Chemical formulas of the inhibitors discussed in this study. Inhibitory potency towards human thrombin is given as kinetic inhibition constant K_i with the standard deviation from averaging of at least three measurements. Relative differences of the thermodynamic properties between inhibitors as indicated by the arrows are given in kJ/mol.

Results and Discussion - Analysis of crystal structures

All six inhibitors show an overall similarity in their binding mode with respect to the active site of human thrombin as indicated by the crystal structures of the corresponding complexes. This common binding mode is presented in **Figure 32a**, using the example of inhibitor **3**. The central proline moiety is perfectly accommodated below the side chains of Tyr 60A and Trp 60D of the 60-loop, similarly to the binding of the valine side chain in the natural substrate fibrinogen.[28] The two peptide bonds adjacent to the pyrrolidine moiety of the proline residue of the ligands are involved in an elaborate hydrogen-bonding network to the backbone of the enzyme, along with a structural water molecule captured next to Gly 216 (**Figure 32b**). Similar to the natural substrate, all inhibitors form a β -sheet like dual ladder H-bonding network with the backbone residues 214 to 216 of the protein. The ligand's terminal amino group and its adjacent carbonyl function form hydrogen bonds with distances of 2.8 – 3.2 Å to the corresponding functionalities of Ser 214 and Gly 216. Furthermore, the terminal most likely positively charged amino group of inhibitors **1** to **7** forms a charge-assisted hydrogen bond to the carbonyl oxygen of Gly 216. The different interaction patterns experienced in the S1 pocket by the *m-chloro*-benzylamides **1** - **3** and the benzamidine-based inhibitors **4** - **6** have been discussed elsewhere.[124] They take only a marginal influence on the overall binding mode of the closely related inhibitors, particularly when considering binding to the S3 pocket.

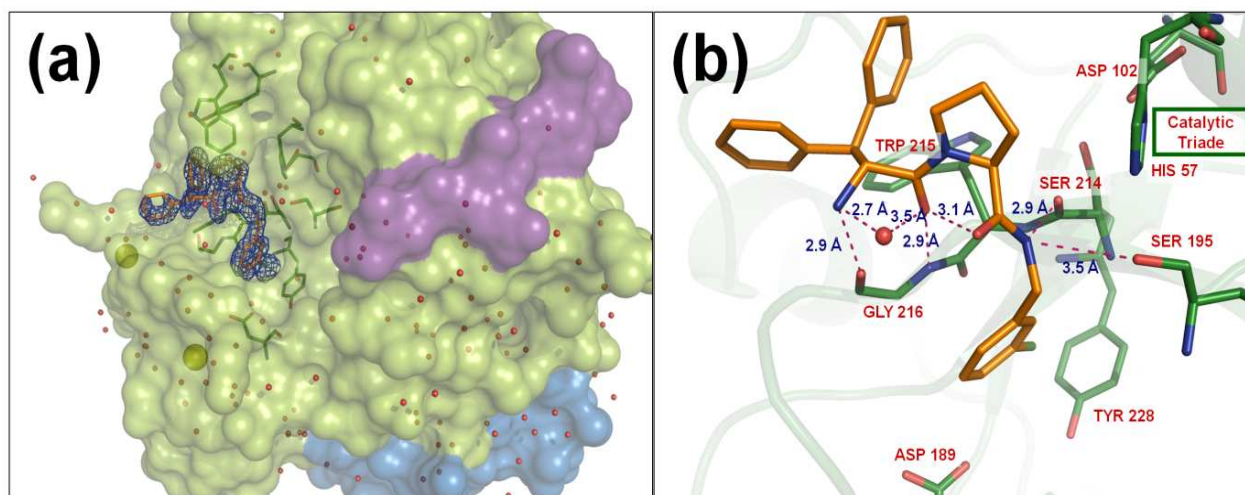


Figure 32 Inhibitor **3** in complex with human thrombin blocked at the exosite by hirugen. **(a)** View on the active site with solvent accessible surface of thrombin's heavy chain in pale green, light chain in blue and hirugen in violet. Two refined sodium ions are shown as yellow spheres, water molecules as red spheres and the inhibitor skeleton in orange sticks, heteroatom color-coded. The $F_o - F_c$ difference electron density for **3** is depicted in blue at 2.5σ . **(b)** Active site residues are represented by green sticks, ligand **3** is shown in orange. The red sphere represents the water molecule being involved in a hydrogen-bonding network. Hydrogen bonds are indicated as broken lines in magenta.

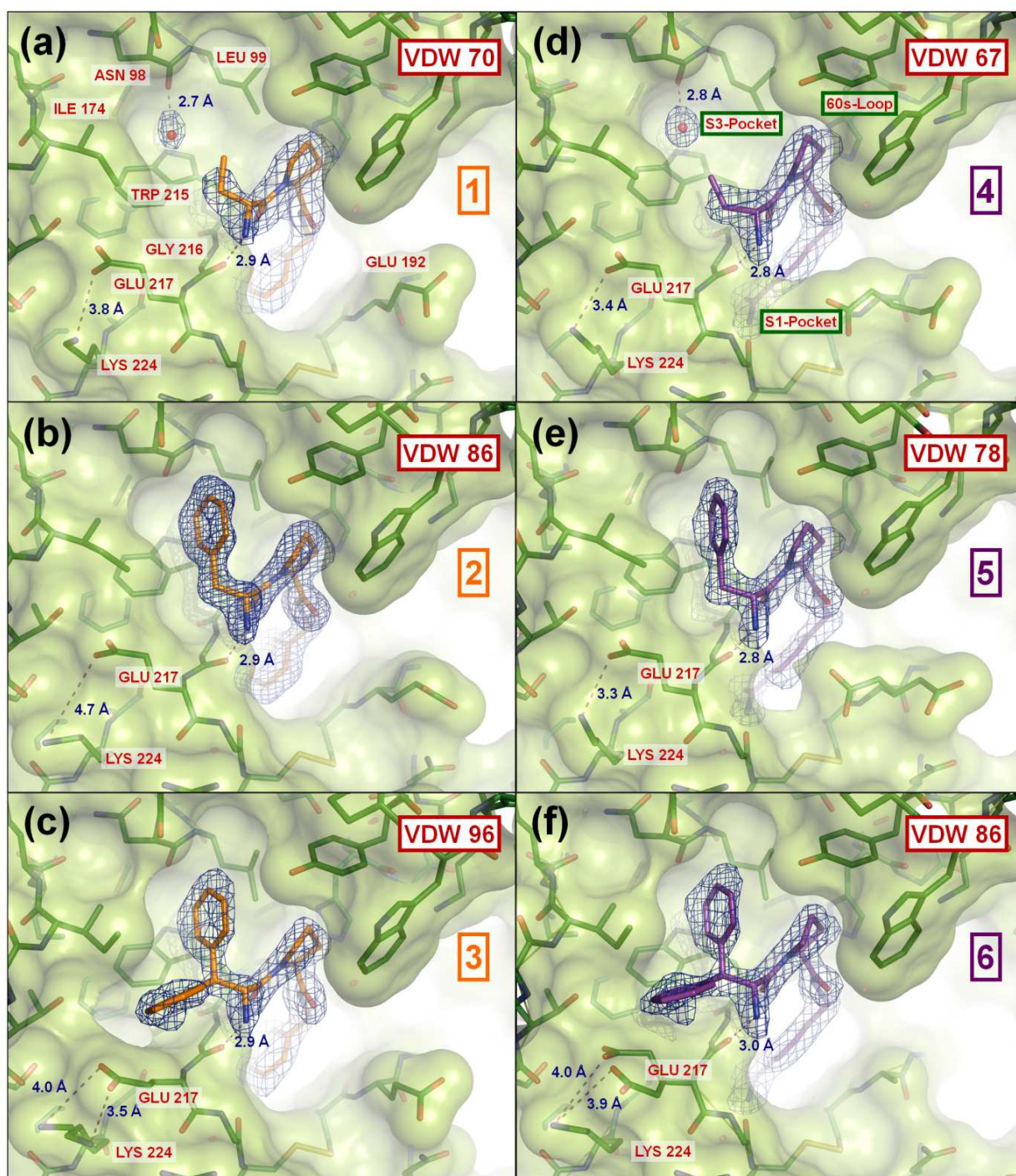


Figure 33 View from top on the crystal structures of inhibitors **1** - **6** (a - f) in complex with human thrombin. The solvent accessible surface of thrombin is depicted in pale green, amino acids are represented by green sticks. Inhibitors **1** - **3** are shown in orange, inhibitors **4** - **6** in purple, heteroatoms color-coded. The $F_o - F_c$ difference electron density for all inhibitors is depicted in blue at 2.5σ , differently dense meshes represent different resolutions achieved for the crystal structures. Important hydrogen bonds are indicated as broken lines in magenta. In a red box the number of calculated van der Waals contacts is given for each complex.

The crystal structures of **1** and **4** with the short ethyl side chain reveal that the hydrophobic S3 pocket of the enzyme remains virtually unoccupied by these ligands. The difference in the electron density indicates the presence of a structural water molecule that is hydrogen-bonded to the backbone carbonyl oxygen of Asn 98 (**Figures 33a + 33d**). The *B*-factors for the refined water molecules in the S3 pocket are 21.3 Å² for the complex with inhibitor **1** and 20.5 Å² in the case of inhibitor **4**. As these values are only slightly above the average *B*-factors for the side chains of the surrounding amino acids Leu 99, Ile 174 and Trp 215 (17.0 Å² and 16.6 Å², respectively) it can be concluded, that these crystallographically observed water molecules are rather tightly bound to the hydrophobic pocket, most likely due to their hydrogen bonds to Asn 98. In the crystal structure of uncomplexed thrombin[124], a water molecule was found at the same place indicating that this accommodation of a structural water in the hydrophobic pocket is not depending on the presence of a bound inhibitor. For inhibitors **1** and **4**, the terminal methyl group of the ethyl substituent is not well defined in the electron density, suggesting enhanced residual mobility of this side chain. In terms of volume, this group is small with respect the size of the S3 pocket, thus a rather free rotation of this substituent can be assumed. The phenyl rings of inhibitors **2** and **5** displace the water molecule from the previously uncomplexed S3 pocket (**Figures 33b + 33e**) and form tight hydrophobic contacts to the surrounding amino acids, particularly Trp 215, Leu 99 and Ile 174. This interaction can be quantified by calculating the number of van der Waals contacts (a “hydrophobic heavy atom distance” below 4.33 Å is counted as a “contact”). They increase from 70 to 86 and 67 to 78, while comparing **1** to **2** and **4** to **5**, respectively (**Figure 33**). Compared to the ethyl derivatives **1** and **4**, the hydrogen-bonds in **2** and **5** between the ligand’s terminal amino functionality and Gly 216 are not altered upon replacement to the larger benzyl substituent.

In the crystal structures of inhibitors **3** and **6** with thrombin, the best planes through the two phenyl rings form an angle of 107.1° and 107.7° with each other, respectively (**Figures 33c + 33f**), giving rise to a butterfly-like conformation. The second phenyl ring, present in these two inhibitors (relative to **2** and **5**), clearly induces a shift of Glu 217 on side of the protein (**Figures 33b** vs. **33c** and **33e** vs. **33f**, respectively). This shift results in the opening of a new small hydrophobic cavity, allowing the bulky inhibitor to bind to the adapted active site. The glutamate side chain has been refined with two alternative conformations in case of inhibitor **6**. In both orientations, the terminal -CH₂COOH portion rotates towards Lys 224, which slightly changes the spatial placement of its terminal amino group in all six complexes. This lysine side chain, which can also be refined with two conformations in case of inhibitor **3**, is most likely affected by crystalpacking. Accordingly, its actual placement in aqueous solution is difficult to estimate based on the current crystal structure determinations. Nevertheless, we observe the rearrangement of the carboxylate group of Glu 217 towards the positively charged amino group of Lys 224 as the most prominent crystallographically feature for the enhanced binding of the bis-phenyl methane derivatives **3** and **6** compared to the D-Phe

derivates **2** and **5**. The additional increase of calculated van der Waals contacts achieved by the ligands with the second phenyl ring (**2**→**3** from 86 to 96, **5**→**6** from 78 to 86) is smaller than the increase calculated for the addition of the first phenyl moiety in both series (**1**→**2** from 70 to 86, **4**→**5** from 67 to 78) (**Figure 33**). The remaining binding features of the inhibitors, especially the β -sheet like dual ladder hydrogen bonding to Gly 216 show only minor differences with respect to each other. In all six structures, the conformation of Glu 192 at the entrance of the S1 binding pocket is scattered over multiple orientations and thus appears to be spatially rather unconstrained. This observation is seen in many structure determinations of thrombin complexes deposited in the PDB (see **Figure 34**).

Further evidence for the observed protein adaptivity based on a Relibase search

A search query addressed by Relibase[125] retrieved six additional crystal structures of bis-phenyl methane inhibitors in complex with human thrombin. All structures were crystallized in space group C2, similar to the complexes studied in this contribution (pdb-codes 1AIX, 1AI8, 1TA2, 1H8I, 1H8D and 1C4V). Whereas in the complex 1C4V, Glu 217 is refined as a structurally reduced “alanine”, in the remaining complexes the glutamate is shifted towards Lys 224 similarly to the observation in our data (**Figure 34**, in green). Superimposed with these structures, eleven randomly selected thrombin-inhibitor complexes from the PDB are shown (**Figure 34**, in blue, PDB-codes 1A3B, 1A46, 1AWF, 1JWT, 1D3D, 1ZRB, 1SB1, 1ZGI, 1QBV, 1D4P, 1TA6). In the latter complexes, this shift of Glu 217 cannot be observed. Thus, the adaptive replacement of Glu 217 is observed as a most likely unique binding feature for the bis-phenyl methane inhibitors.

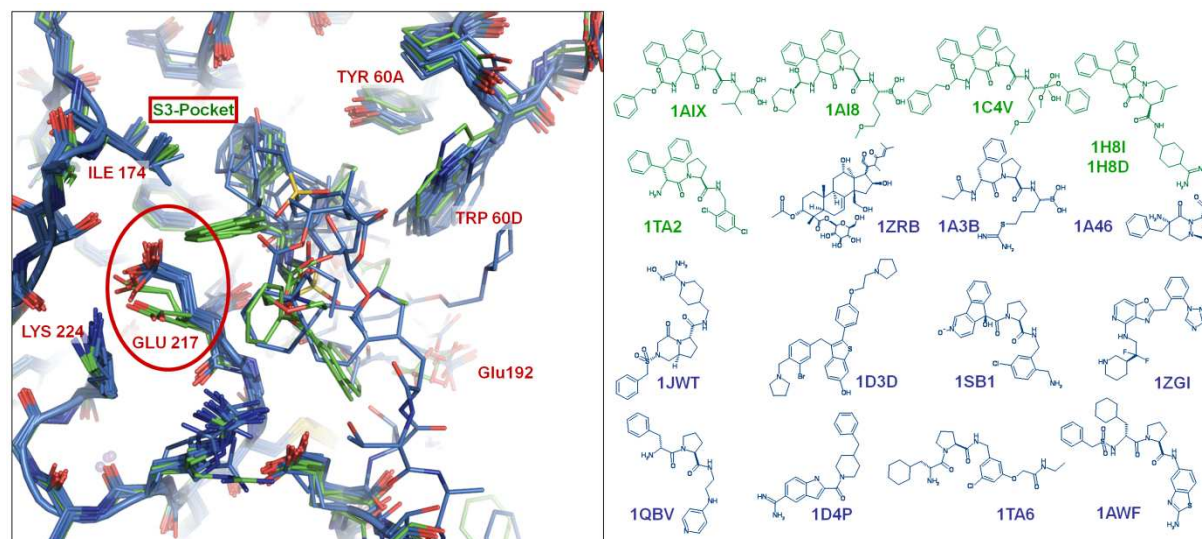


Figure 34 Alignment of thrombin crystal structures retrieved from PDB. Eleven randomly chosen structures of thrombin-inhibitor complexes are shown in blue, chemical formula of inhibitors are given on the right. Five complexes resulting from RELIBASE search for bis-phenyl methane inhibitors (formula on the right) are shown in green, heteroatoms color-coded. All structures were aligned onto the highest resolution structure 1A3B.

Factorization into enthalpic and entropic contributions by Isothermal Titration Calorimetry

In order to factorize the Gibbs free energy of binding ΔG^0 , the standard binding enthalpy ΔH^0_{bind} and the dissociation constant K_D were determined by ITC experiments for all inhibitors. The entropic contribution to binding $-T\Delta S^0$ has been calculated as difference between ΔG^0 (derived from K_D) and ΔH^0_{bind} according to the Gibbs-Helmholtz equation. The results are listed in **Table 3**.

Table 3 Binding data ΔG^0 , ΔH^0 and $-T\Delta S^0$ (in kJ/mol) of inhibitors as determined by ITC. Errors indicate standard deviation from triplicate measurements

Inhib.	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	$-T\Delta S^0$ (kJ/mol)
1	-31.3 ± 1.9	-33.5 ± 0.3	2.2 ± 1.9
2	-35.4 ± 0.8	-37.1 ± 1.1	1.7 ± 0.3
3	-39.6 ± 0.2	-45.6 ± 1.4	6.0 ± 1.6
4	-40.1 ± 0.2	-38.7 ± 0.7	-1.4 ± 0.6
5	Tris	-46.1 ± 0.6	-40.1 ± 2.9
	Tricine	-44.5 ± 0.6	-40.5 ± 1.5
	Hepes	-46.2 ± 0.3	-39.1 ± 1.2
	Phosphate	-44.0 ± 1.2	-44.8 ± 0.4
6	Tris	-48.5 ± 2.0	-47.5 ± 1.1
	Tricine	-47.2 ± 0.8	-43.8 ± 4.9
	Hepes	-52.3 ± 1.4	-45.4 ± 1.2
	Phosphate	-46.4 ± 1.3	-40.8 ± 0.5
7	Tris	-38.9 ± 0.2	-35.6 ± 1.1
	Tricine	-36.4 ± 0.4	-32.2 ± 1.3
	Hepes	-39.7 ± 0.9	-32.1 ± 0.2
	Phosphate	-39.1 ± 3.9	-31.6 ± 0.7
	Average	-38.5	-32.9
8	Tris	-32.6 ± 0.3	-29.0 ± 3.3
	Tricine	-33.1 ± 1.2	-17.4 ± 0.6
	Hepes	-32.8 ± 1.6	-14.3 ± 2.7
	Phosphate		~0
	Buffer corrected		-1.4
	Ionization 0.6 His57		-18.0
	Buffer/Ioniz. corrected	-32.8 (av.)	-19.4
			-13.2

The Gibbs free energy of binding ΔG^0 derived by microcalorimetry correlates well with the affinity data determined by a kinetic assay (**Figure 35**) and confirms the stepwise increase in binding affinity from inhibitor **1** to **6**.

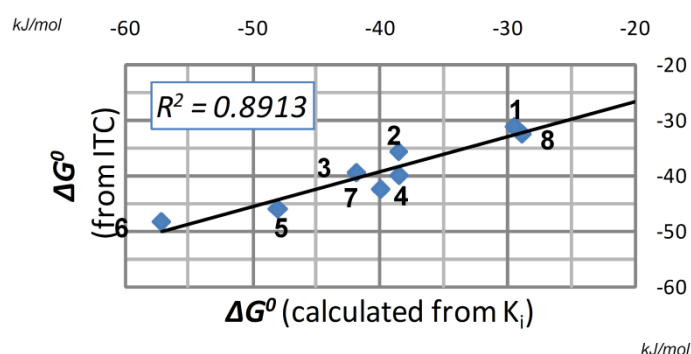


Figure 35 Correlation between Gibbs free energies of binding ΔG^0 as determined by ITC and as calculated from the kinetically determined K_i ($\Delta G^0 = -RT \ln K_i$)

For inhibitors **5** and **6**, ΔH^0_{bind} was measured from varying buffer conditions, considering Tris, Hepes, Tricine and pyrophosphate buffer, respectively. The plots of ΔH^0_{bind} for these two inhibitors against the heat of ionisation of the applied buffers (**Figure 36**) reveal no significant buffer dependency of ΔH^0_{bind} within the error limits, thus at first glance overlaying protonation steps seem to be lacking and any netto changes in the protonation states of the involved binding partners appear negligible.

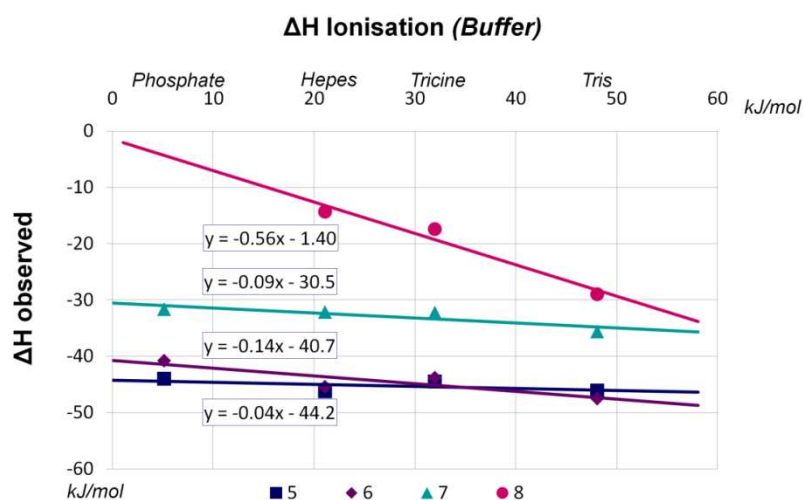


Figure 36 Buffer dependency of ΔH^0_{bind} for inhibitors **5**, **6**, **7** and **8**. Whereas for **5**, **6** and **7** only marginal dependency on the employed buffer is observed, for inhibitor **8** a significant release of 0.56 protons upon complex formation was detected.

Nevertheless, to provide further evidence about possibly superimposed protonation effects on the thermodynamics of binding, buffer dependencies of ΔH^0_{bind} were traced for inhibitor **7** (Figure 37) and its acetylated derivative **8**.

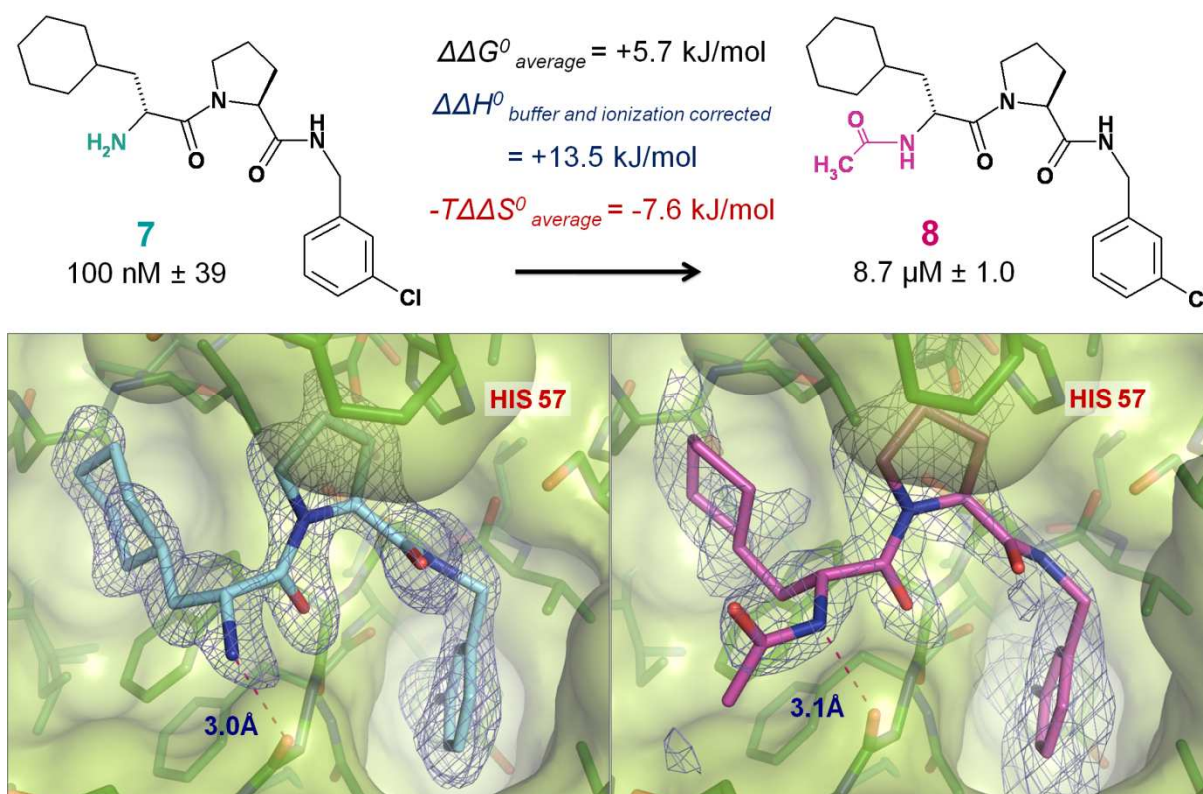


Figure 37 Chemical formulas of inhibitors **7** (left) and **8** (right) and their crystal structures in complex with thrombin. Inhibitory potency towards human thrombin is given as kinetic inhibition constant K_i with the standard deviation from averaging of at least three measurements. Relative differences of the thermodynamic properties between inhibitors after correction for observed protonation effects are given in kJ/mol.

Surprisingly, a net proton release of approximately 0.6 mol protons upon complex formation could be detected only for inhibitor **8** (Figure 36). As this inhibitor does not feature any functional group being able to change its protonation state under the applied experimental conditions, protons must be released upon complex formation by the amino acids next to the active site. As evidenced by previous studies[31] and elaborate pK_a calculations[126], the most likely candidate is histidine 57 of the catalytic triade (Figures 2 and 7), which releases protons upon lowering of the local dielectric constant in its environment as a result of inhibitor binding. Apparently, a similar net effect cannot be detected for inhibitors **1** to **7**. Most likely, their primary amino functionality (estimated pK_a in water: 7.3), assumed to be approximately 25% protonated under the applied pH conditions of 7.8 in aqueous solution, experiences a pK_a shift upon binding to the enzyme, so that this group picks up a comparable

amount of protons as released by the histidine residue. We assume that the protonated forms of these inhibitors bind to thrombin. We believe that their high potency is partly determined by the formation of a charge-assisted hydrogen bond with Gly 216. In the total inventory, a mutually compensating exchange of protons between protein, inhibitor and buffer seems to be given. This would explain that overall no buffer dependency of ΔH_{bind}^0 for inhibitors **1** to **7** is observed. The heat of ionization is in particular large for nitrogen functional groups, thus requiring a correction of the heat signal. In the present scenario protons are exchanged between such groups (e.g. imidazole moiety of histidine, amino group of ligand) - however they occur with opposite sign, resulting in first approximation in a mutual compensation. In total, no heat effects are detected. Even though the heat of ionization of a primary amino group should be larger than that of an imidazole moiety, slight differences in the stoichiometry of the proton release versus uptake can compensate such differences. We therefore believe, in light of the given experimental accuracy, such effects can be neglected. In the following, we will discuss and interpret the observed ΔH_{bind}^0 of **1** to **6**, particularly in a relative comparison. Small residual contributions, possibly not fully considered in our analysis above will cancel out in such a relative comparison.

In order to discuss the thermodynamic properties of **8**, a detailed correction must be performed. The heat of ionization for a histidyl moiety appears to be 30 kJ/mol[127]. If His 57 releases 0.6 mol protons upon Thr-**8** complex formation, this release should be endothermic and involves about 18 kJ/mol. The experimentally measured heat is lowered by this value, thus the authentic ΔH_{bind}^0 is more enthalpic (-19.4 kJ/mol) as actually observed after buffer correction, which would result in -1.4 kJ/mol (**Table 3** Binding data ΔG^0 , ΔH^0 and $-\Delta S^0$ (in kJ/mol) of inhibitors as determined by ITC. Errors indicate standard deviation from triplicate measurements, **Figure 36**).

For ligand **1**, ΔH_{bind}^0 is most likely affected by the largest experimental uncertainty in the series, as the binding isotherm of this weak binding inhibitor deviates from an ideal sigmoidal shape at the beginning of the titration experiment. One has to notice, that the indicated error in **Table 3** reflects only the statistical standard deviation across multiple determinations, therefore in addition a larger inevitable systematic error has to be assumed, particularly for the study of this weak binding inhibitor.

The relative differences of binding enthalpy ΔH_{bind}^0 and entropy $-\Delta S^0$ between inhibitors, as determined by ITC, are given in **Figure 31**. Following the trends in the series, it is obvious that the gain in affinity for the introduction of the first phenyl ring (**1**→**2**, **4**→**5**) can be explained neither as a dominant gain in entropy nor in enthalpy. Considering first the more reliable measurement of the stronger binding **4** and **5**, $\Delta\Delta G^0$ factorizes for the benzamidine inhibitors (**4**→**5**) in a way that filling the thrombin S3 pocket by the first phenyl ring benefits

mainly from an entropic advantage by 4.7 kJ/mol, along with a slight gain in ΔH_{bind}^0 of 1.4 kJ/mol.

This fact would be in agreement with the observed displacement of the structural water molecule from the S3 pocket, likely overlaid by the repelling of additional ones not observable in X-ray crystallography. Displacement of water molecules from a hydrophobic binding pocket is assumed to result in an entropic advantage.[40, 41] In the present case, the two crystallographically observed water molecules in the hydrophobic pocket are able to form at least one specific hydrogen bond to the protein, thus the hydrophobic effect is less pronounced than expected. Our current observation corresponds quantitatively to other complexes, where a contribution in the same range has been observed[111]. The small enthalpic contribution might result from favorable van-der-Waals contacts experienced between the ligand's phenyl portion with the residues in the S3 pocket. A similar partitioning is not observed for the ligand pair **1** and **2**. One possible explanation for this observation may be the more error-prone data collected for the weak binding inhibitor **1**, which possibly complicates a straightforward comparison of **1**→**2** with **4**→**5**. Also it is not self evident that similar complexes show a similar kind of "cross talk" between the portions binding in the S1 and the S3 pocket.

In contrast to this observation, introduction of the second phenyl ring into the inhibitor skeleton clearly results in a large gain in ΔH_{bind}^0 of 8.5 kJ/mol for **3** and 7.4 kJ/mol for **6** with respect to **2** and **5**. This overwhelming increase in the enthalpy of binding for the bis-phenyl methane inhibitors is accompanied by a moderate entropic penalty of 4.3 kJ/mol and 5.2 kJ/mol, for **3** and **6** respectively.

Following the changes in **Figure 31** from left to right shows that the exchange of the *m*-chloro-benzyl by a benzamidine moiety occupying the S1 pocket (**1**→**4**, **2**→**5**, **3**→**6**) leads to a gain in binding affinity of about 9-10 kJ/mol. Interestingly, this exchange provides both an enthalpic and an entropic advantage, thus an increase in ΔG^0 without any detrimental enthalpy/entropy compensation. Such a profile is desired in an ideal optimization process. However, proceeding from **1**→**4** to **2**→**5** and **3**→**6**, the relative contributions of both aspects change according to the size of the substituent placed into the S3 pocket. Obviously, the effect becomes more of an entropic nature, the stronger the ligand is already fixed in the S3 subsite of the binding pocket.

Correlation of thermodynamic and structural features

The crystallographically observed displacement of a water molecule from the S3 pocket by the first phenyl ring of inhibitors **2** and **5** in comparison to the ethyl substituted **1** and **4** is reflected by a mainly entropic gain in binding affinity considering the more solid data of the benzamidine pair. An enhanced hydrophobic contact is formed between inhibitor and en-

zyme disrupting the ordered solvation shell around ligand and protein. This allows release of water molecules previously associated with an apolar surface patch of the protein into bulk water. In the latter environment they form more, but weaker interactions to other solute molecules. This overall entropically favoured situation is partially counterbalanced by the fact that the inhibitor molecule loses certain degrees of conformational and residual mobility upon complex formation. Furthermore, filling the S3 pocket will constrain the previously more freely activated conformational degrees of freedom of the amino acids Leu 99 and Ile 174 forming the rim of this cavity. These residues will lose some of their degrees of rotational freedom. The overall hydrophobic fitting into the S3 pocket is still slightly exothermic in nature, most likely due to favourable dispersive ligand-protein interactions.

Inhibitors **3** and **6** share the observed adaptive rearrangement of Glu 217 of the target protein in common. For these two bis-phenyl methane inhibitors a strong enthalpic signature of binding is observed, which we explain by the rotation of the negatively charged glutamate towards the protonated ammonium group of Lys 224. This electrostatic attraction leads to an enthalpically favourable charge-assisted hydrogen bond that is reflected by a strong exothermic binding event. The formation of this salt-bridge is paralleled by a considerable entropic penalty. Possibly, this observation explains why the salt-bridge formation between Glu 217 and Lys 224 is only established, once the hydrophobic portion of the inhibitor constrains and efficiently occupies the opened and in the following solvent accessible space.

In consequence of the conformational rearrangement of Glu 217 the new hydrophobic cavity is opened and favourably accommodates the second phenyl ring of the bis-phenyl methane inhibitors. In the uncomplexed situation such an increase of the hydrophobic surface of the protein appears unfavourable, mainly for adverse desolvation properties.

Interestingly, the replacement of the *m*-chlorobenzyl moiety in the S1 pocket by the benzamidine substituent results in nearly the same $\Delta\Delta G^0$ contribution (**1**→**4**, **2**→**5**, **3**→**6**). However, the more firmly the ligand is fixed in the S3 pocket, the less enthalpic is the addition of the salt-bridge in the S1 pocket. The replacement by the more potent benzamidine anchor becomes more entropy driven with regard to the tighter fixation in the S3 pocket. With some care, this observation corresponds to the series **1**→**2** and **4**→**5**. Here a similar $\Delta\Delta G^0$ contribution is experienced (-4.1 vs -6.0 kJ/mol). However, in the case with a more firmly fixed anchoring of the ligand in the S1 pocket (benzamidine anchor in **4** and **5**), the increase from ethyl to benzyl in S3 is of stronger entropic nature. In case of the weaker anchoring group in P1 (*m*-chlorobenzyl in **1** and **2**), the introduction of the phenyl ring correlates with a stronger enthalpic signal. The two series **1**→**4**, **2**→**5**, **3**→**6** and **1**→**2**, **4**→**5** indicate a more complex correlation likely also involving changes within the protein. However, both series clearly indicate that a simple additivity model considering enthalpic and entropic contributions is not given for the present example. If similar trends are observed for the free energy of binding, they result from a quite strongly deviating partitioning of enthalpic and entropic contributions.

Analysis of the crystal structures for inhibitors **7** and **8** (**Figure 37**) provides a possible explanation for the significant loss of (buffer and heat of ionization corrected) binding enthalpy of about 13.5 kJ/mol upon acetylation of the amino functionality. Although **8** is still forming a hydrogen bond to Gly 216, this situation appears to be enthalpically less favourable, presumably as the amide functionality cannot provide such a strong charge assistance to the formed H-bond. Furthermore, in the complex structure of **8** with thrombin a noticeable deviation from planarity is observed for the newly introduced amide bond. This distortion from the more favourable planar geometry must be induced upon complex formation and must to some extent be paid by the binding enthalpy of this inhibitor. The lower enthalpy is partially balanced by an entropically more favourable binding of **8** leading to an affinity loss of $\Delta\Delta G^0 = 5.7$ kJ/mol. Apart from the above mentioned contributions, another difference determining the thermodynamic profiles of **7** and **8** are deviating desolvation properties of both inhibitors that might explain part of the entropic discrepancy.

Conclusions

The presented data provide an explanation for the affinity boost of the second phenyl ring introduced by bis-phenyl methane inhibitors binding to thrombin. The first phenyl ring experiences an hydrophobic contact by filling the S3 pocket of the enzyme and thus an entropic advantage for binding is observed. The crystallographically observed water molecule, which is released from the hydrophobic pocket, is hydrogen bonded to the backbone of the enzyme. The second phenyl moiety enhances binding affinity obviously by inducing an enthalpically favourable rearrangement of Glu 217 towards Lys 224 in the neighbourhood of the S3 pocket. This results in the formation of a salt bridge and creates a small hydrophobic cavity ready to accommodate the second phenyl moiety. This effect is partly compensated by an unfavourable entropic contribution. For the development of potent thrombin inhibitors as drug candidates, this observation might be of importance as the described adaption of the protein is not obvious and thus predictable from classical design or could be regarded in rational structural modifications. The positioning of appropriate bulky functionalities addressing this region of the protein might be a promising strategy to further gain binding affinity and to drive simultaneously other physicochemical parameters such as hydrophobicity or solubility into the desired direction.

Additionally, this example emphasises the power of combining structural information about binding modes of protein-inhibitor complexes with thermodynamic data to characterize the binding event to provide a rational explanation for the observed magnitude of binding affinity. Our study contributes to a better understanding of the details responsible as driving forces for inhibitor binding. It hopefully guides the view of medicinal chemists towards a more rational and tailored optimization of their ligands towards a given drug target.

2.6 Cooperativity in Ligand Binding

Most strategies to predict binding affinity ignore that individual contributions to the free energy of binding may influence each other. Although these positive or negative cooperative effects undoubtedly occur and can be designated as one of the fundamental properties of non-covalent interactions [23, 128], the implementation into current scoring functions as well as the awareness among medicinal chemists appears to be nonsatisfying. In a recent review 10 docking programs and 37 scoring functions were evaluated and it was concluded that none of the scoring functions or docking algorithms make a useful prediction of binding affinity [10]. For this disastrous result, the deficient consideration of cooperative effects in non-covalent binding is certainly one reason.

Cooperativity as described by D.H. Williams [24] is a phenomenon whereby two inhibitor fragments, joined together into one molecule, give a complete inhibitor with a binding affinity greater than the sum of its parts. This non-additivity, more precisely to be specified as *multivalency*, is well-known to all chemists in more simple cases such as the formation of chelate complexes by certain metal-ions. Its relevance for the binding affinity of small molecules to a macromolecular target has still to be proven and explored as a prerequisite for the improvement of scoring algorithms used in affinity prediction.

Within the UB_THR series of thrombin inhibitors, an example of non-additive behavior among the free energies of binding, as calculated from the kinetically determined inhibition constant, captured our attention (**Figure 38**). In this case, the attachment of a phenyl ring to the low affinity inhibitor UB_THR_14 increases the free energy of binding by -3.1 kJ/mol. The potency of the weak binder can alternatively be increased by introducing a primary amine functionality in correct stereochemistry, resulting in a gain of -9.6 kJ/mol for the free energy of binding.

Thus, by adding both, the phenyl ring *and* the amine, one would expect a gain of -12.7 kJ/mol as the sum of both contributions. The experimentally determined increase in affinity turned out to be -18.6 kJ/mol, so a substantial cooperative effect of almost 6 kJ/mol has to be concluded.

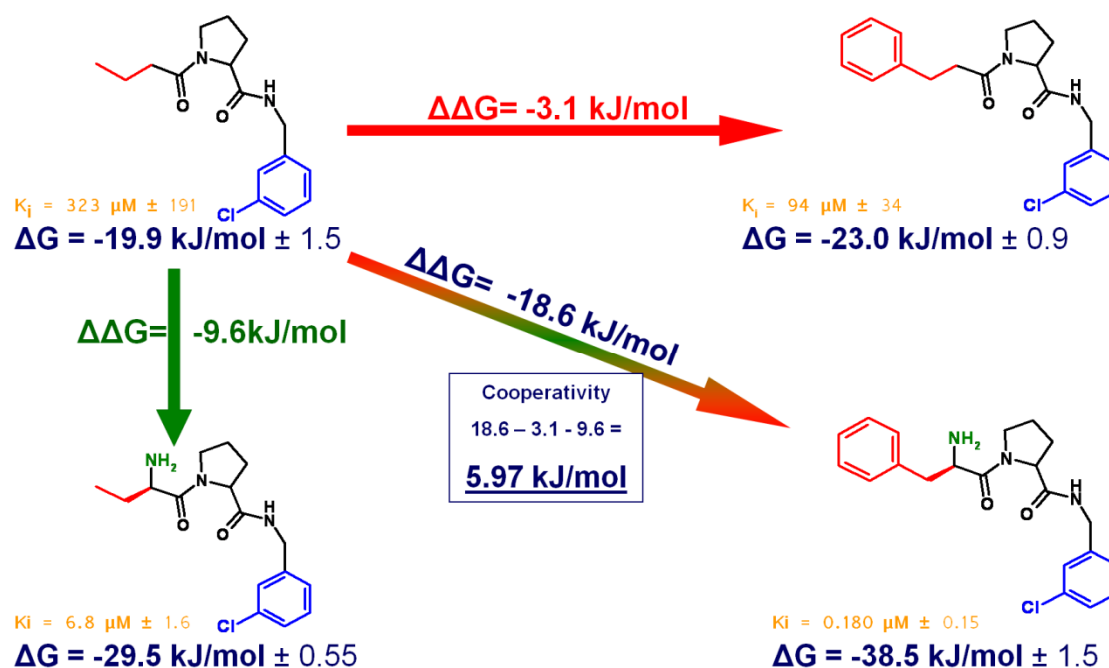


Figure 38 Non-additivity among Inhibitors UB_THR 14, 17, 19 and 22. Free Energies of binding are calculated from kinetically determined inhibition constant K_i .

The confirmation of the binding mode of the inhibitors in thrombin by X-ray crystallography did not work out for UB_THR_14 and 17, as these lipophilic compounds turned out to have very low aqueous solubility even using DMSO as cosolvent. The high concentration necessary for soaking them into thrombin crystals could not be achieved though numerous attempts under different conditions. Thus, the correct binding mode of the weak binding inhibitors can only be assumed to be analogous to the inhibitor with medium affinity UB_THR_19 and 22.

Further efforts towards understanding the cooperativity or non-additive behavior of non-covalent interactions were done by systematically investigating the above described example. Two series of inhibitors were synthesized, one with the primary amino functionality and one in the absence of this H-bond donor. The lipophilic part addressing the thrombins S3 pocket was increased in small steps from hydrogen to methylcyclohexyl (**Figure 39**, in red).

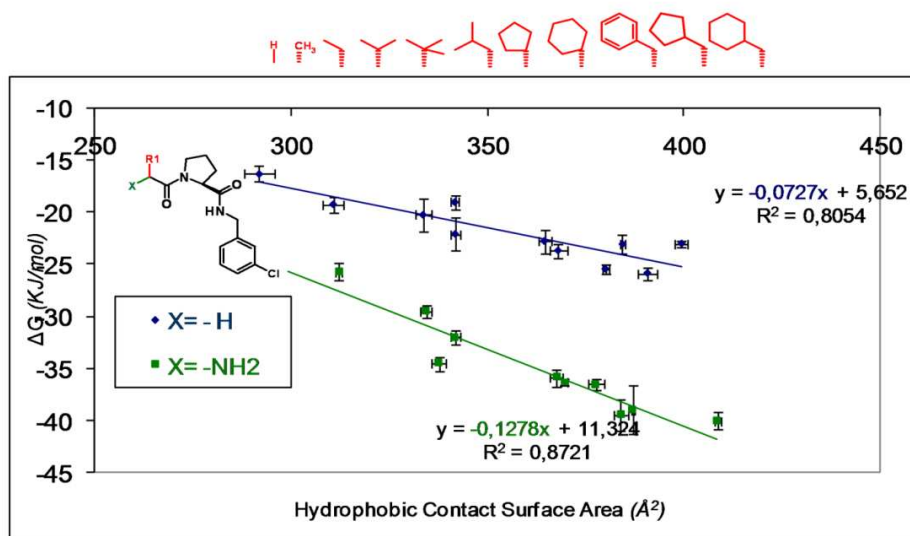


Figure 39 Correlation plot. The free energy of binding as determined by a kinetic assay is plotted against the calculated hydrophobic contact surface area between protein and ligand. The geometry of the corresponding complexes has been modeled on the basis of the crystal structure with the *dichloro*-analogue of UB_THR_23 (PDB-code 1TA2), bearing a benzyl portion in the pocket. Error bars indicate the statistical standard deviation from multiple experiments.

All synthesized compounds were tested for their kinetic inhibition constant towards thrombin. In a molecular modeling study, the hydrophobic contact of each compound with thrombin was quantified. The hydrophobic contact surface area was calculated using SYBYL 7.3. All modeling was done starting with the previously published crystal structure 1TA2 from PDB [26], the *dichloro* analogue of UB_THR_23, as the starting reference structure. Modifications were made to the inhibitor as needed and then the resulting structure was minimized using the SYBYL force field. The inhibitors were further docked into the active site and minimized inside the protein to obtain the best fit. Once the optimized geometry was obtained the hydrophobic contact surface area shared among both binding partners was calculated.

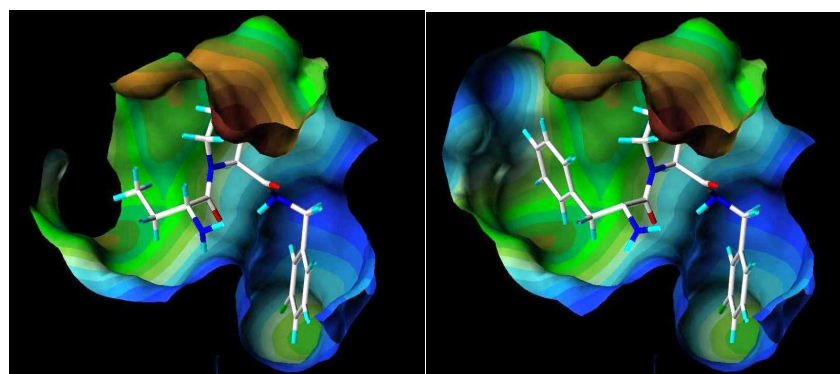


Figure 40 Increase of the hydrophobic contact surface (particularly in the S3 binding pocket) exemplary from UB_THR_19 (left) and UB_THR_22 (right) as calculated in SYBYL.

The experimentally obtained K_i values, the Gibbs free energies of binding and the calculated hydrophobic contact surface areas are as listed in the following table.

X	R	K_i (nM)	\pm	ΔG (kJ/mol)	\pm	Hydrophobic Contact Sur- face Area (\AA^2)	\pm
-H	-H	1,462	409.3	-16.2	1.68	292.0	3.76
-H	Methyl	444.5	133.2	-19.1	0.69	310.8	2.59
-H	ethyl	322.6	190.5	-19.9	0.01	333.7	2.02
-H	isopropyl	155.0	86.0	-21.7	0.68	341.9	1.36
-H	t-butyl	481.9	139.7	-18.9	0.26	341.7	1.15
-H	isobutyl	109.4	46.3	-22.6	0.72	364.6	1.62
-H	cyclopentyl	72.41	22.13	-23.6	0.26	368.1	2.20
-H	cyclohexyl	34.49	6.34	-25.5	0.73	380.1	0.81
-H	Methyl cyclopentyl	92.96	11.03	-23.0	0.41	399.6	1.66
-H	Methyl cyclohexyl	29.73	7.45	-2.8	0.57	390.9	2.27
-H	benzyl	94.3	34.3	-23.0	0.65	384.5	0.65
NH_2	-H	8.083	4.218	-29.1	0.59	299.2	0.47
NH_2	methyl	32.96	11.79	-25.6	0.20	312.3	0.74
NH_2	ethyl	6.810	1.600	-29.5	0.38	334.4	1.33
NH_2	isopropyl	2.538	0.660	-31.9	0.47	341.9	1.24
NH_2	t-butyl	0.918	0.277	-34.5	0.38	337.8	1.88
NH_2	isobutyl	0.536	0.192	-35.8	0.86	367.7	1.58
NH_2	neopentyl	0.405	0.097	-36.5	0.39	378.0	1.94
NH_2	cyclopentyl	0.429	0.059	-36.3	0.36	369.7	0.85
NH_2	cyclohexyl	0.145	0.110	-39.0	0.79	380.0	1.82
NH_2	Methyl cyclopentyl	0.101	0.039	-39.9	0.88	408.8	0.76
NH_2	Benzyl	0.179	0.148	-38.5	0.96	387.2	0.40

The Gibbs free energy for binding was calculated from the measured K_i -values and plotted against the hydrophobic contact surface area, which resulted in a linear plot for each series (Figure 39).

The results obtained in the plot are striking. The two straight lines obtained, stay linear as the size of the hydrophobic side chain increases. Additionally, the slopes of the two lines, which reflect the gain in free energy of binding per \AA^2 , are significantly different.

A linear correlation between Gibbs free energy and hydrophobic contact surface area has previously been reported by Maurizio Brunori and co-workers for the burial of hydrophobic residues at the interface between protein subunits [129]. The interface stabilization free energy (slope) was reported as $-15 \pm 1.2 \text{ cal/mol}$ ($0.0627 \pm 0.005 \text{ kJ/mol}$) upon burial of one \AA^2 of hydrophobic surface.

In our case, for the first series ($X = -H$) the slope is $-0.0727 \pm 0.006 \text{ kJ/mol/\AA}^2$ whereas for the second series ($X = -NH_2$), the slope or the improvement in binding affinity is $0.1278 \pm 0.009 \text{ kJ/mol/\AA}^2$ of hydrophobic contact surface area added. The values we obtained are slightly different as compared to those values reported by Brunori et.al. Supposedly, this difference can be attributed to the difference in the type of interactions being evaluated. The value reported in the cited publication is for hydrophobic interactions in a protein-protein interaction whereas we are looking at a small molecule-protein interface. Obviously, our data are in a range of values reported in the literature ($0.08\text{--}0.20 \text{ kJ/mol/\AA}^2$) for hydrophobic interactions in ligand-receptor complexes [30].

The error in the two slopes was obtained by fitting the data to a linear regression model using WinNonLin Professional. The student T-test was performed on the two slopes to confirm that the difference in the slope were outside experimental error ($P < 0.01$).

To further elucidate, why the gain in affinity for the increased hydrophobic part of the molecule depends on the presence of the amino functional group, additional compounds have been evaluated. The corresponding benzamidine series to the previously discussed *m*-chloro benzylamides show, apart of higher affinity to thrombin, a significantly higher aqueous solubility. They thus give access to a complete set of crystallographically determined binding modes and to reliable microcalorimetric data from ITC.

First considering only the free energy of binding ΔG^0 as calculated from the kinetic inhibition constant, an interesting thermodynamic cycle results for 12 selected compounds (Figure 41).

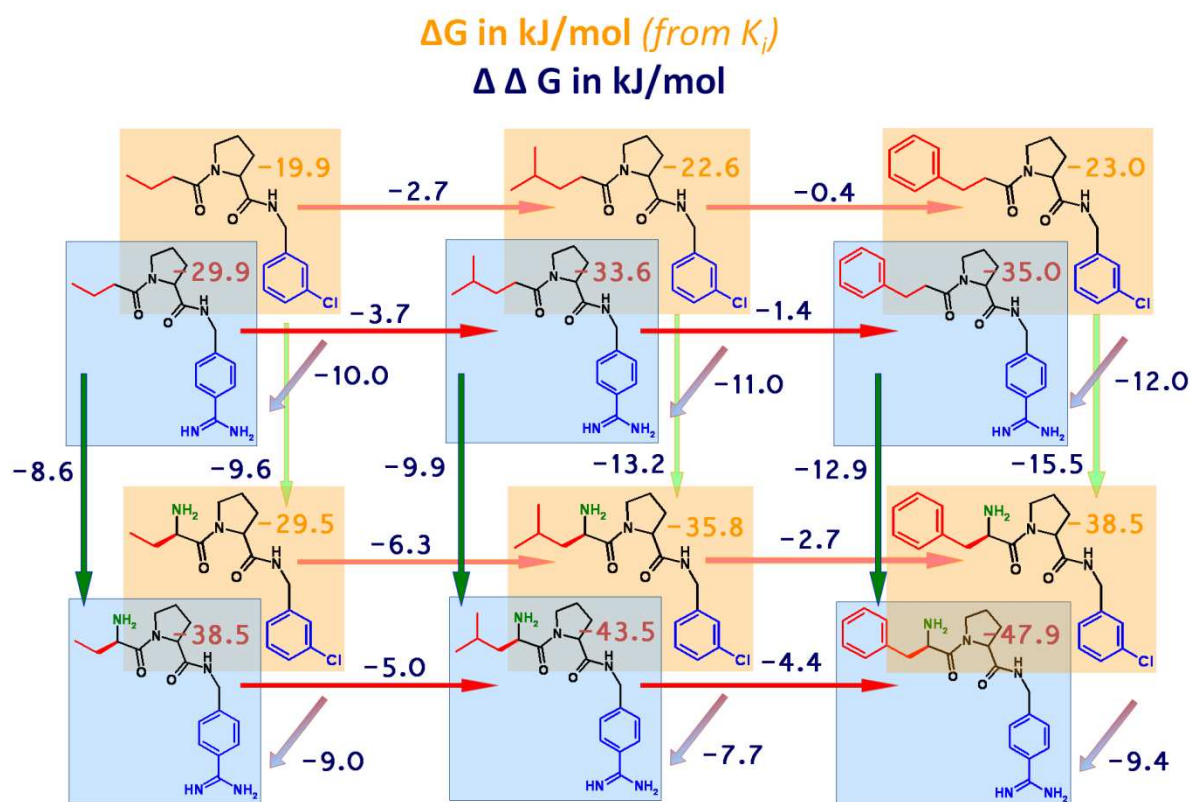


Figure 41 Thermodynamic cycle for 12 discussed compounds. All free energies of binding to thrombin ΔG^0 as determined by a kinetic assay are given in orange, their relative difference between the compounds in blue.

This thermodynamic cycle shows that the cooperative phenomenon, which was observed for the *m*-chloro benzylamides, exists as well for the benzamidines, though being about 4 kJ/mol less pronounced. The inclusion of a medium sized side chain allows further understanding of the attractive forces responsible for inhibitor binding.

A closer look at the X-ray structures, considering the temperature factors of the determined thrombin-inhibitor complexes, gives further impression also on the dynamics of the inhibitors bound to the active site. **Figure 42** clearly shows, that the benzamidine moiety is firmly fixed in the S1 pocket (low temperature factors) and the proline ring under the 60s loop shows rather low thermal motion in the crystal. Much higher *B*-factors are observed for the

lipophilic side chain addressing the S3 subpocket of the enzyme, though the difference electron density allowed unambiguous location of all atoms during refinement of the structure.

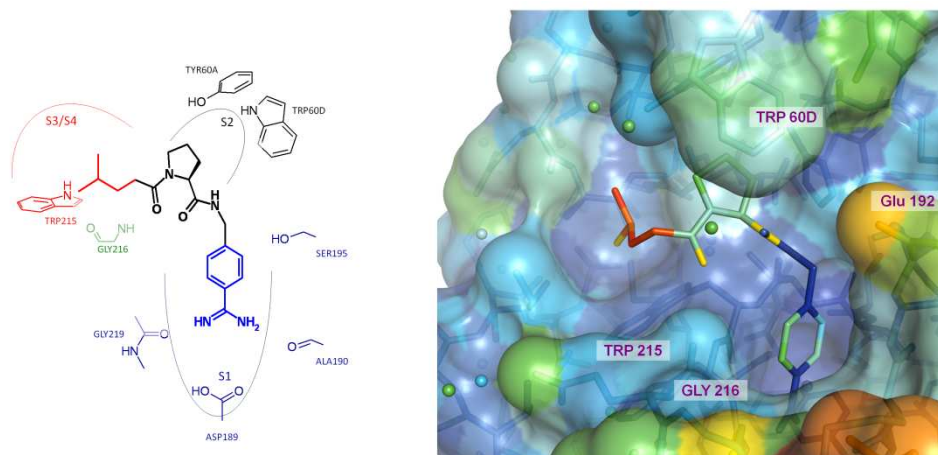


Figure 42 Crystallographically determined binding mode of UB_THR_26 in complex with thrombin. Colors were assigned to all atoms according to their temperature factors, from blue (low *B*-factor) to red (high *B*-factor).

We analyzed the *B*-factors separately for each inhibitor relative to the neighboring amino acids exposed to the binding site. This normalization was performed to correct for any superimposed difference in the diffraction properties of the various crystal structures being compared. In this comparison, a ratio of *B*-factors of ligand relative to the binding pocket residues close to 1 suggests equal thermal motion of the ligand and the binding cavity and full occupancy of the inhibitors in the crystal. An increase in the ratio would result from higher thermal motion of the inhibitor or from lower occupancy. As there were no concerns about full occupancy of the highly soluble and tightly binding benzamidines, we interpret a high ratio of the *B*-factors of ligand relative to the binding pocket residues as an indicator for enhanced residual mobility of the ligands or ligand portions in the active site. The following table shows the compilation of *B*-factors from the crystal structures and the thermodynamic data from microcalorimetry in TRIS-buffer. Again, an entropically beneficial binding event correlates with high mobility of the inhibitor in the binding site. This observation, which was already similarly discussed in chapter 2.3., points out again the importance of residual entropy with respect to the free energy of binding, at least in a qualitative way.

Inhib.	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	$-\Delta S^0$ (kJ/mol)	B Inhibitor (Å ²)	B Binding Site (Å ²)	B Inhibitor / B Binding Site
UB19	-31.3 ± 1.9	-33.5 ± 0.3	2.2 ± 1.9	35.1	18.5	1.90
UB21	-35.1 ± 0.3	-42.7 ± 2.9	7.5 ± 3.0	21.4	19.5	1.10
UB22	-35.4 ± 0.2	-37.1 ± 1.1	1.7 ± 0.3	15.7	14.5	1.08
UB24	-32.8 ± 0.3	-27.0 ± 1.4	-5.8 ± 1.7	23.6	14.9	1.58
UB26	-37.4 ± 1.2	-22.7 ± 1.7	-14.7 ± 2.9	21.9	16.1	1.36
UB27	-37.8 ± 0.8	-28.6 ± 0.5	-9.3 ± 0.8	18.5	14.7	1.26
UB29	-40.1 ± 0.2	-38.7 ± 0.7	-1.4 ± 0.6	18.2	16.3	1.12
UB31	-42.9 ± 0.2	-34.5 ± 0.1	-8.4 ± 0.3	17.2	14.6	1.18
UB32	-46.1 ± 0.6	-40.1 ± 2.9	-6.1 ± 3.4	11.4	10.9	1.08

The derived crystallographic and thermodynamic data enables us to compare individual inhibitors and to find possible explanations for the phenomenon of cooperativity.

Before comparison of the thermodynamic data (measured in TRIS buffer), one has to be aware of putative overlaid protonation effects upon inhibitor binding. A negligible heat of protonation has been experimentally demonstrated for UB_THR_32 (chapter 2.5) and thus can be assumed for the analogous inhibitors UB_THR_27 and 29. This buffer independency of their binding enthalpy was shown to be a result of virtually, in terms of heat, compensating proton exchange between histidine 57 in the active site and the inhibitors primary amino functionality. Such a proton interchange is impossible for the inhibitors UB_THR_24, 26 and 27 which do not feature the primary amine. Thus, we assume a release of 0.6 mol protons (mostlikely by His 57) upon binding of these inhibitors to superimpose the heat of binding analogous to the secondary amide UB_THR_91, for which this magnitude was experimentally demonstrated (chapter 2.5). Accordingly, the experimentally observed enthalpy for UB_THR_24, 26 and 27 has to be corrected for the heats associated with the release of 0.6 mol protons by histidine 57 and the uptake of the same amount by the buffer. The heat of ionization for a histidyl moiety is appears to be 30 kJ/mol[127]. If His 57 releases 0.6 mol protons upon complex formation, this release should be endothermic and involves about 18 kJ/mol. The experimentally measured heat is lowered by this value, thus the authentic ΔH^0_{bind} is more enthalpic as observed after buffer correction. For this buffer correction, an

uptake of 0.6 mol protons and a heat of ionization for TRIS buffer of 48 kJ/mol[130] was assumed, thus the exothermic proton uptake by the buffer contributes 28.8 kJ/mol to the observed enthalpy. Accordingly, for UB_THR_24, 26 and 27 the pure enthalpy of binding ΔH_{bind}^0 is in sum 10.8 kJ/mol lower than the experimentally enthalpy observed in TRIS buffer. Thus ΔH_{bind}^0 for UB_THR_24 appears to be -16.2 kJ/mol, for UB_THR_26 it accounts -11.9 kJ/mol and UB_THR_27 binds with $\Delta H_{\text{bind}}^0 = -17.8$ kJ/mol.

The inhibitors with a small hydrophobic n-propyl side chain such as UB_THR_24 and 29 show virtually the same binding mode (**Figure 43**). The uncomplexed S3 pocket hosts a water molecule exhibiting a low temperature factor. Introduction of the amino group leads to a significant decrease in the *B*-factor ratio from 1.58 to 1.12, thus it can be concluded that the inhibitor loses several degrees freedom available for thermal motion.

Overall, this corresponds to an entropic disadvantage with respect to the entire binding process of $-T\Delta\Delta S = 15.2$ kJ/mol, which is more than counterbalanced by an enthalpic gain of $\Delta\Delta H = -22.5$ kJ/mol due the formation of the additional, supposedly charge-assisted hydrogen bond between the ligand's amino function and the carbonyl group of Gly 216. The H-bond already present in the ligand lacking the amino group and formed between the ligand's carbonyl group and the amide NH group of Gly 216 is only slightly affected by the additional hydrogen bond. Altogether, the data for UB_THR_24 and 29 provide an example for the classical enthalpy-/entropy-compensation. Again, differences in the dehydration properties of the inhibitors clearly contribute to the thermodynamic profiles.

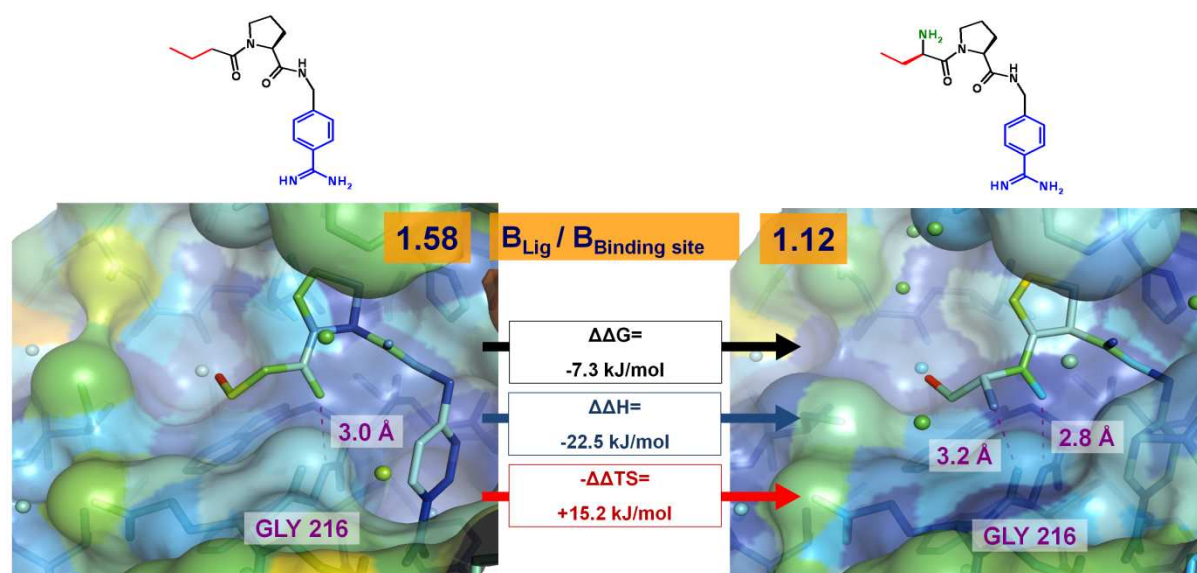


Figure 43 UB_THR_24 and 29 in complex with thrombin. Colors were assigned to all atoms according to their temperature factors, from blue (low *B*-Factor) to red (high *B*-Factor).

A similar comparison performed for the medium-sized side chain of a *sec*-butyl group shows a slightly different picture (**Figure 44**). First of all, the *sec*-butyl side chain seems to experience some kind of “conflict of interest”. To form an optimal lipophilic contact and to further displace the hosted water from the S3 pocket requires rupture of an optimal hydrogen bond formed between the ligand’s carbonyl group and the amide nitrogen of Gly 216. This contact is actually formed in this complex, however with an expanded distance of 3.6 Å (**Figure 44**, left). Upon introduction of the amino group, the complete dual ladder β -sheet-like hydrogen bonding network between inhibitor and Gly 216 is formed with two shorter distances (3.0 and 3.2 Å). However, they prevent the isopropyl side chain from forming optimal lipophilic contacts with the hydrophobic binding pocket. Also, in the present case of related inhibitors, the *B*-factor ratio decreases from 1.36 to 1.18, which most likely results from a more tightly fixation of the inhibitor in the active site. The entropic disadvantage for this fixation appears to be more pronounced than in the case of the *n*-propyl side chain ($-\Delta\Delta S = 17.1$ vs 15.2 kJ/mol), for which the additional reduction in the rotational degrees of freedom for the larger *sec*-butyl side chain seems to be a plausible explanation.

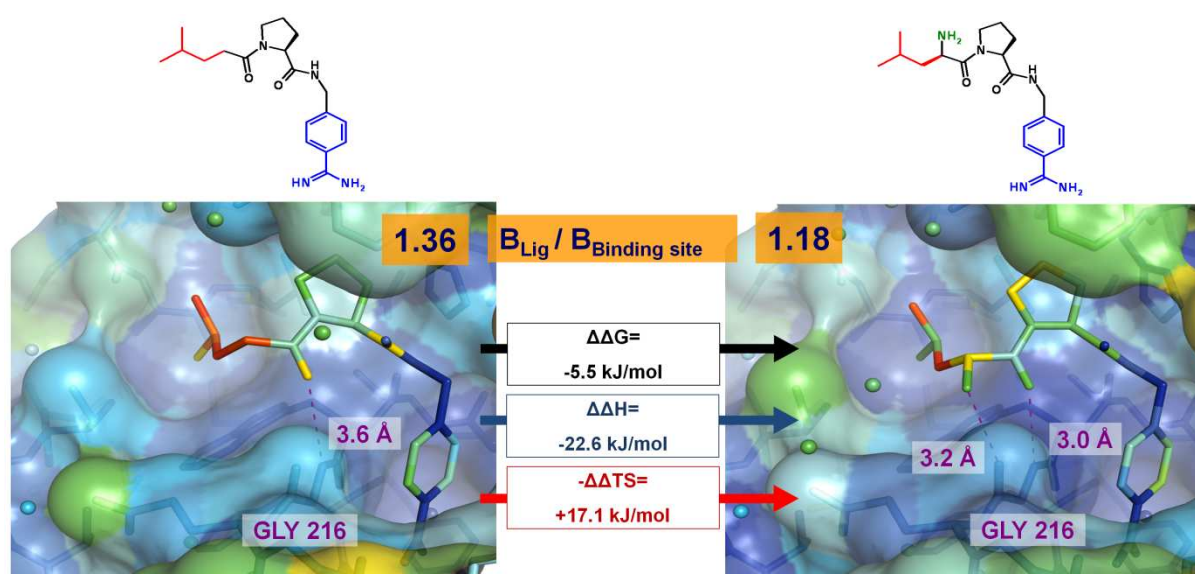


Figure 44 UB_THR_26 and 31 in complex with thrombin. Colors were assigned to all atoms according to their temperature factors, from blue (low *B*-factor) to red (high *B*-factor).

A third comparison will be performed for the phenethyl side chain present in UB_THR_27 and 32, for which the strongest cooperative effects have been observed in the benzamidine as well as in the *m*-chloro-benzylamide series. Here, the introduction of the amino group causes hardly any differences in the binding mode, except the additionally formed hydrogen bond and a slight reduction in the H-bond distance (3.3 vs 3.1 Å) for the hydrogen bond between the ligand’s carbonyl and the nitrogen of Gly 216. Again, we observe a significant decrease in the *B*-factor ratio from 1.26 to 1.06 (**Abbildung 45**), indicating that also in the present complexes an enthalpy-/entropy compensation is in operation. Interestingly enough,

the entropic penalty of $-T\Delta\Delta S = 14.6$ kJ/mol is lower than in the cases with the two aliphatic side chains. An explanation for this observation can most likely be found by the fact that the large phenethyl side chain is already rather tightly fixed via hydrophobic contacts to the S3 pocket even in absence of the additional amino group. This view is supported by an almost identical binding mode exhibited by both ligands. Thus, going from UB_THR_27 to UB_THR_32, the formed complexes have less degrees of freedom to loose through the introduction of the additionally formed H-bond.

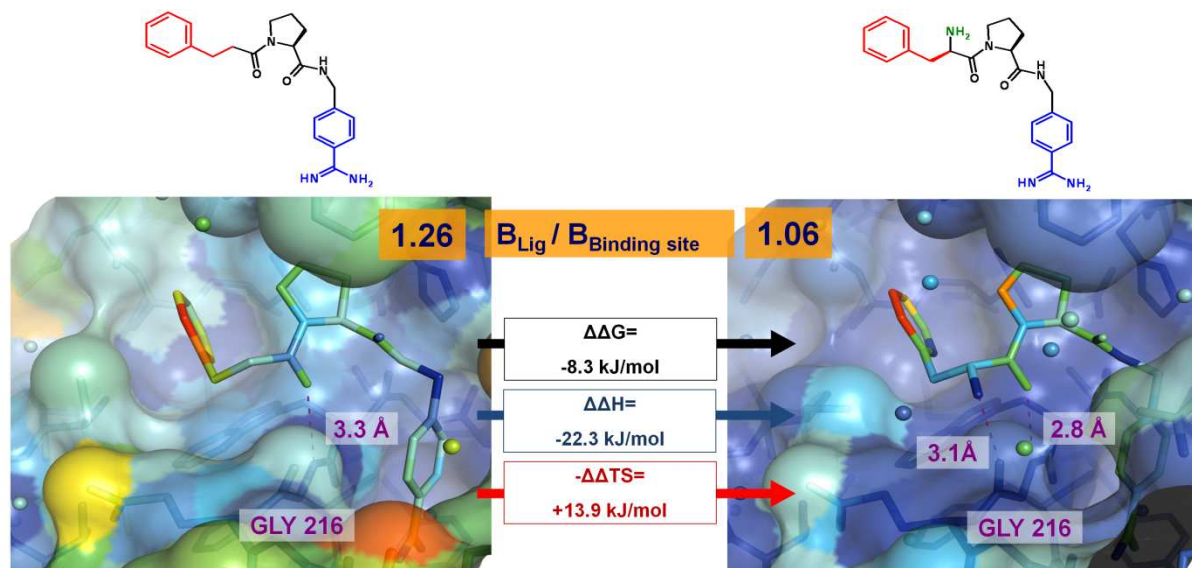


Abbildung 45 UB_THR_27 and 32 in complex with thrombin. Colors were assigned to all atoms according to their temperature factors, from blue (low *B*-factor) to red (high *B*-factor).

The differences in the amount of enthalpy-/entropy compensation provide a satisfying explanation for the phenomenon of cooperative effects in non-covalent interactions. In a relative comparison a ligand, which is already firmly bound to its receptor, has less degrees of conformational freedom (and thus less residual entropy) to loose upon introduction of additional functional groups forming further attractive interactions. In our case, the mutual affinity enhancing interactions were of different nature (hydrogen bonding and lipophilic contact), but we can expect them to operate equivalently for all kind of interactions once they constrain the ligand's degrees of freedom. This effect, in other contexts described as zipper mechanism, can be traced in detail for our presented data. They provide instructive insights into the fine details of molecular recognition.

2.7 Untersuchungen zum Protonierungszustand der Inhibitoren

Zum Verständnis der enthalpischen Beiträge zur Bindungsaffinität durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Inhibitor und Enzym ist es von entscheidender Bedeutung, die Ladungszustände der freien Bindungspartner und des gebildeten Komplexes zu kennen. Für Inhibitoren mit basischen und sauren Funktionen hängt die Ladung vom pH-Wert des Lösungsmittels ab, ebenso der Protonierungszustand der Aminosäuren in der Bindetasche des Proteins. Für die „titrierbaren“ Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Arginin, Lysin, Histidin, Cystein und Tyrosin existieren Literaturwerte für die Aziditätskonstanten pK_a der Seitenketten in Wasser (**Abbildung 46**). Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Wert der lokalen Dielektrizitätskonstante ϵ davon abhängt, wie „vergraben“ Proteinbindetaschen im Vergleich zur Lösung sind, und dass der pK_a -Wert sich durch die Bindung eines Inhibitors zusätzlich verschieben kann. Der exakte Protonierungszustand ist röntgenkristallographisch selbst bei äußerst hoher Auflösung ($< 1\text{\AA}$) kaum bestimmbar, ein solcher Datensatz steht für Thrombin bis heute nicht zur Verfügung. Die Säurekonstanten pK_a für den repräsentativen Inhibitor UB_THR_32 konnten dankenswerter Weise potentiometrisch (0.15 mM KCl, 23 °C) im Labor der Firma Roche bestimmt werden (**Abbildung 46**).

Amino Acid	pK_a
Asp	3.8
Glu	4.3
Arg	12.0
Lys	10.5
His	6.08
Cys (-SH)	8.28
Tyr	10.1

$pH = pK_a + \lg [A^-] / [HA]$

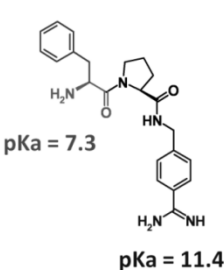


Abbildung 46 Aziditätskonstanten pK_a für Aminosäureseitenketten und den Inhibitor UB_THR_32

Aus diesen Werten für die Aziditätskonstanten lässt sich schließen, dass bei dem für die mikrokalorimetrischen Messungen verwendeten pH 7.8 der Benzamidinanker des Inhibitors im Messpuffer protoniert vorliegt. Während an der Oberfläche des Proteins bei diesem pH-Wert die Arginyl-, Lysinyl- und Tyrosinylseitenketten ebenfalls hauptsächlich im protonierten Zustand vorliegen sollten sowie Aspartyl- und Glutamyreste höchst wahrscheinlich deprotoniert sind und eine negative Ladung tragen, ist der Ladungszustand für Histidine und Cysteine nur schwierig eindeutig abzuschätzen. Noch problematischer ist die Zuweisung der Ladungszustände für die titrierbaren Aminosäuren in den Bindetaschen, da durch lokale

Abweichungen in der Dielektrizitätskonstanten ϵ eine Verschiebung der Aziditätskonstanten über mehrere Größenordnungen auftreten kann. Detaillierte Berechnungen der Ladungszustände in den Bindetaschen sind möglich [126, 131, 132], verlangen allerdings enorme Rechenkapazitäten. Da in der *Active Site* von Thrombin keine freien Cysteinyreste vorkommen, ist für die Bindung des Inhibitor vor allem die Ladung des katalytischen Histidins 57 von Bedeutung. Allerdings konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass bei dem in sehr ähnlichen Bindungsmodus bindenden Melagatran keine Änderung des Protonierungszustandes zu beobachten ist [31].

Für die Bindungsenthalpie entscheidend ist der Protonierungsgrad der primären Aminofunktion des Inhibitors. Aus dem gemessenen pK_a 7.3 lässt sich mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ($pH = pK_a + \lg ([A^-] / [HA])$) berechnen, dass in der Pufferlösung bei pH 7.8 ungefähr 25 % der Inhibitormoleküle protoniert vorliegen. Daraus ergibt sich die Frage, welche Form des Inhibitors an das *Target* bindet. Die stark negative Bindungsenthalpie für alle untersuchten Inhibitoren, die diese primäre Aminofunktion aufweisen, lässt vermuten, dass der Inhibitor in seiner protonierten Form bindet und so eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zu Gly 216 ausbildet. Zur Klärung der Frage, ob sich die Bindungsaffinität durch den pH-Wert beeinflussen lässt, wurden ITC-Titrationsen für den Inhibitor UB_THR_32 bei verschiedenen pH-Werten in TRIS-Puffer durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 47** zusammengefasst.

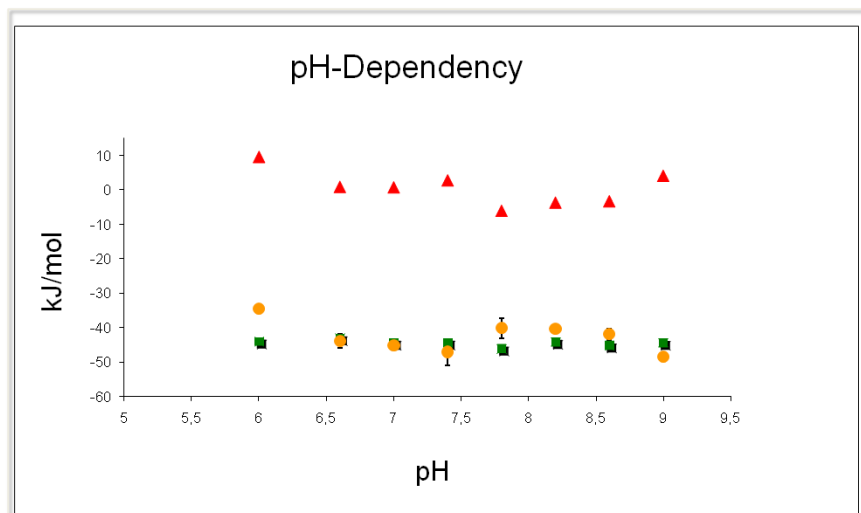


Abbildung 47 pH-Abhängigkeit von ΔG (grüne Quadrate), ΔH_{obs} (gelbe Kreise) und $-T\Delta S$ (rote Dreiecke) für die Bindung von UB_THR_32 an Thrombin in TRIS-Puffer.

Es ist klar zu erkennen, dass die Bindungsaffinität (grüne Quadrate) nicht vom pH-Wert abhängt. Für den enthalpischen Beitrag zur Bindung (gelbe Kreise) ist eine leichte, aber nicht systematische Abhängigkeit zu beobachten. Der Grund für diese Beobachtung liegt wahrscheinlich darin, dass in allen Fällen die protonierte Form des Inhibitors an das Enzym bindet und gebundene Moleküle aus dem Säure-Base-Gleichgewicht des Inhibitors

nachgebildet werden. Durch das überlagerte Gleichgewicht liegen zumindest im pH-Bereich zwischen 7 und 8 genügend protonierte Inhibitormoleküle vor, die mit ihrer positiven Ladung an Thrombin binden. Für den gesamten untersuchten Bereich ist es jedoch nicht auszuschließen, dass weitere überlagerte Säure-Base-Gleichgewichte verschoben werden. Da bei der ITC aber immer nur die *gesamte* Wärmemenge für das System in der Messzelle detektiert werden kann, ist es über den untersuchten pH-Bereich wahrscheinlich, dass durch die pH-Wert-Veränderung verschiedene Gruppen ihren Protonierungszustand ändern und somit enthalpische Phänomene auftreten, die sich in der Summe wechselseitig kompensieren. Eine ausführliche Diskussion der Protonierungszustände von Inhibitor und der Bindetasche von Thrombin erfolgt anhand der Inhibitoren UB_THR_64 und 91 in Kapitel 2.5.

2.8 Kristallstrukturen weiterer Thrombin-Inhibitoren

2.8.1 Der KNOBLE-Inhibitor MM18

Im Rahmen der Arbeit "KNOBLE, a knowledge-based approach for the design and synthesis of readily accessible small-molecule chemical probes to test protein binding" [109] wurde einer der synthetisierten Inhibitoren mit mittlerer Affinität an das Zielenzym Thrombin für die Kristallstrukturanalyse ausgewählt. Der Inhibitor MM18 (**Abbildung 48**) besitzt als Kernfragment (*S*)-Prolinol, welches aus synthetischen Gesichtspunkten einfach mit Bausteinen zur Bindung in die S1 und S3/S4 Taschen des Enzyms zu verknüpfen ist.

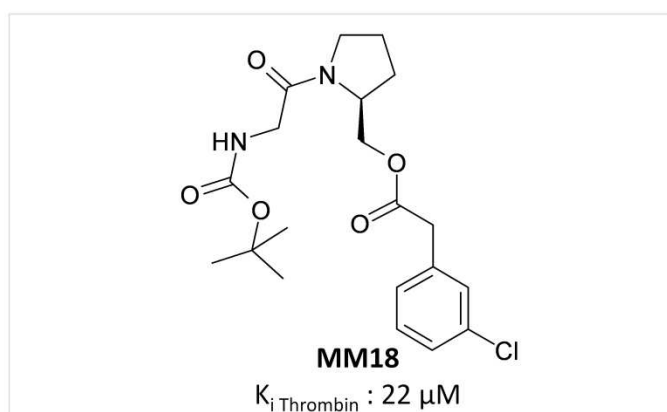


Abbildung 48 KNOBLE-Inhibitor MM18

Das Eindiffundieren des Inhibitors in einen Thrombin Kristall ergab einen Datensatz mit mittlerer Auflösung von 2.2 Å, alle Teile des Inhibitors sind in der Elektronendichte gut definiert.

Bei einer genauen Inspektion der Struktur des Thrombin-Inhibitor-Komplexes wird die geringe Bindungsaffinität plausibel. Zieht man den Vergleich zum bekannten Komplex mit Melagatran, drängen sich die nächsten Optimierungsschritte förmlich auf. Zunächst erscheint die Platzierung des Ester-Sauerstoffes nicht ideal. Er hat keine Donor-Funktion, um eine Wasserstoffbrücke mit der benachbarten Serinseitenkette einzugehen. Weiterhin fällt die Esterverknüpfung zwischen P1- und P2-Rest zu lang aus und sollte um eine Kohlenstoffeinheit verkürzt werden. In MM18 drängt sich das Ester-Carbonylsauerstoffatom regelrecht in eine Wechselwirkung zur NH-Gruppe von Gly 216 hinein. Das hat zur Folge, dass die Wechselwirkung des eigentlich zu diesem Zweck in den Inhibitor eingebauten Glycin-Bausteins in MM18 zur Bildung einer doppelten, parallelen Wasserstoffbrücke mit dem Proteinrückgrat ausbleibt. Daraus lassen sich die folgenden Syntheseschritte für eine weitere Optimierung ableiten: Die viergliedrige Esterverknüpfung sollte durch eine dreigliedrige Amidverknüpfung ersetzt werden. Dies sollte dann zusätzlich in dem Molekülteil mit dem Prolylbaustein das substratähnliche Bindungsmotiv über den Glycinbaustein zu der Aminosäure Gly 216 in Thrombin ermöglichen.

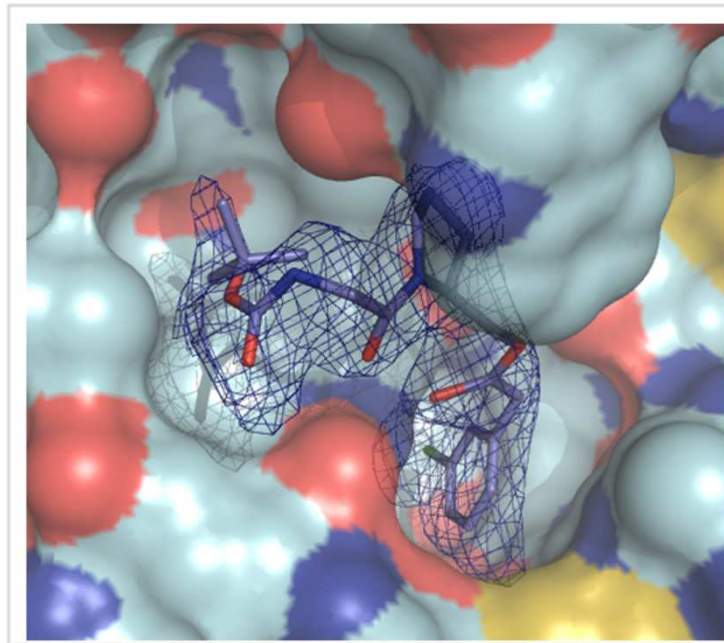


Abbildung 49 Inhibitor MM18 (violett) in Komplex mit Thrombin (hellblau). Die F_o-F_c -Differenzelektronendichte für den Inhibitor ist in dunkelblau bei 2σ dargestellt. PDB-Code 3EGK.

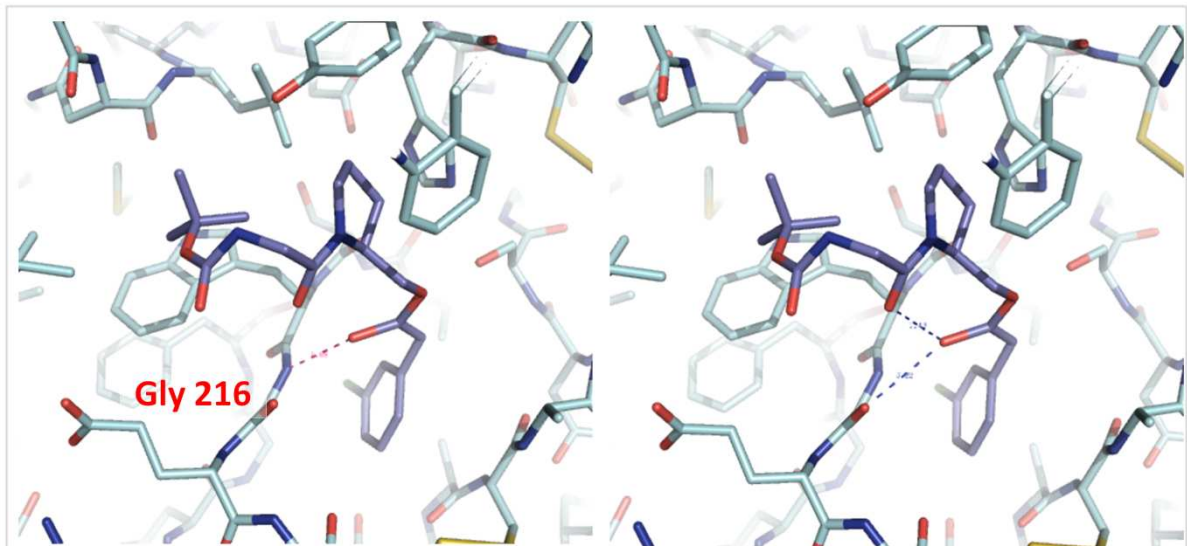


Abbildung 50 Inhibitor MM18 (violett) in Komplex mit Thrombin (hellblau). Attraktive Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien in magenta (links), ungünstige Wechselwirkungen in blau (rechts) dargestellt.

2.8.2 Der duale Faktor Xa- und Thrombininhibitor MI-0002

Als Beispiel für einen *drug-like* dualen Faktor Xa- und Thrombinhemmstoff wurde der Inhibitor MI-0002 aus Arbeiten im Arbeitskreis Steinmetzer ausgewählt.

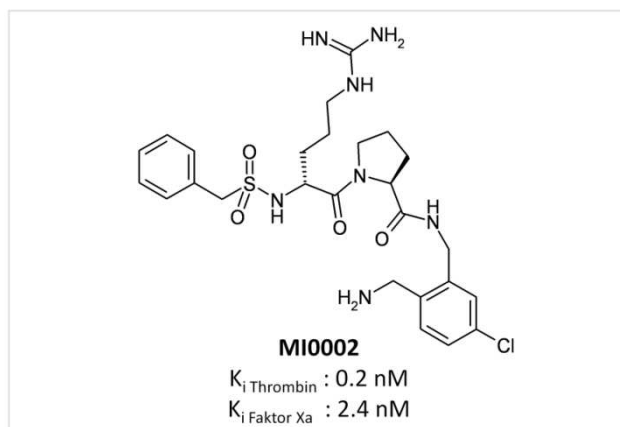


Abbildung 51 Dualer Faktor Xa- und Thrombininhibitor MI-0002

Das *m*-Chloro-Benzylamid als schon bekanntes Erkennungsmotiv für die S1 Tasche von Thrombin ist hier durch eine in *para*-Position zum Chlor angefügte Aminomethylgruppe ergänzt [90, 133]. Ebenfalls vorhanden sind der zentrale Prolinbaustein und die über eine Amidbindung verknüpfte P3-Aminosäure als bewährte Wasserstoffbrückenpartner zur Wechselwirkung mit Glycin 216. Als Aminosäure in P3-Position wurde D-Arginin gewählt, da an dieser Stelle Substituenten mit positiven Ladungen im strukturverwandten Faktor Xa als affinitätssteigernd bekannt sind [134, 135]. Der Inhibitor könnte also als dualer Hemmstoff der Gerinnungsenzyme Faktor Xa und Thrombin für die parenterale Applikation entwickelt werden. Dafür sollte die Rolle der Arginyl-Seitenkette in Hinblick auf die Thrombinbindung geklärt werden. An den N-Terminus dieses Peptidomimetikums ist ein Benzylrest über ein Sulfonamid verknüpft, wodurch eine weitere Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion zur Bindung an das *Target* zur Verfügung steht. Da bisher noch keine Strukturbestimmungen zu Thrombinhemmstoffen mit einem P3-D-Arginylrest durchgeführt wurden, wurde der Inhibitor für die Kristallographie im Komplex mit thrombin ausgewählt.

Der hochaffine und gut lösliche Thrombininhibitor MI-0002 lies sich ohne Zusatz von DMSO direkt aus dem *soaking*-Puffer in einen Thrombinkristall eindiffundieren. Der so präparierte Kristall ergab im Beugungsexperiment einen Datensatz hoher Auflösung, die daraus bestimmte Kristallstruktur konnte bis zu einer Auflösung von 1.53 Å verfeinert werden. Bis auf Teile der Arginyl-Seitenkette ist der Ligand sehr gut in der Elektronendichte definiert. Neben der schwer zu lokalisierenden Guanidino-Funktion wurde auch die Aminomethyl-Gruppe am oberen Ende der S1 Tasche in einer doppelten Konformation verfeinert, die errechneten Besetzungen werden in **Abbildung 52** zugeordnet. Es fällt auf, dass die Arginyl-

Seitenkette trotz ausreichendem Platz nicht in die S3/S4-Tasche bindet, stattdessen konnte an dieser Stelle ein Wassermolekül in der Kristallstruktur beobachtet werden.

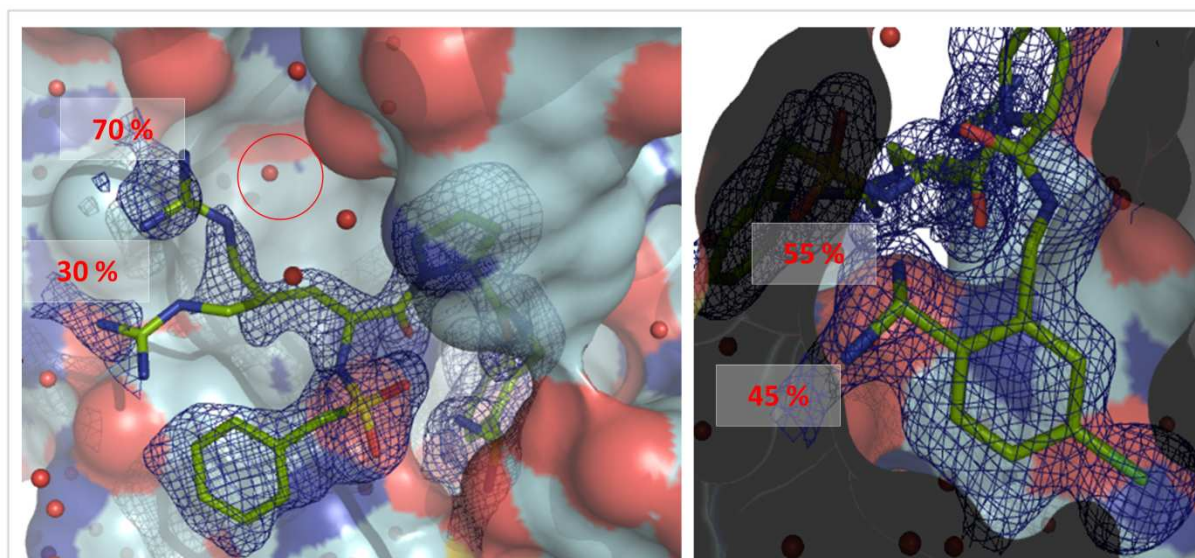


Abbildung 52 Inhibitor MI-0002 (grün) in Komplex mit Thrombin (hellblau). Die F_o-F_c -Differenzelektronendichte für den Inhibitor ist in dunkelblau bei 2σ dargestellt. In rot sind die prozentualen Besetzungen für in doppelter Konformation verfeinerte Teile des Inhibitors zugeordnet. Der rote Kreis markiert die nur mit Wasser gefüllte S3/S4-Tasche. PDB-Code 3EQ0.

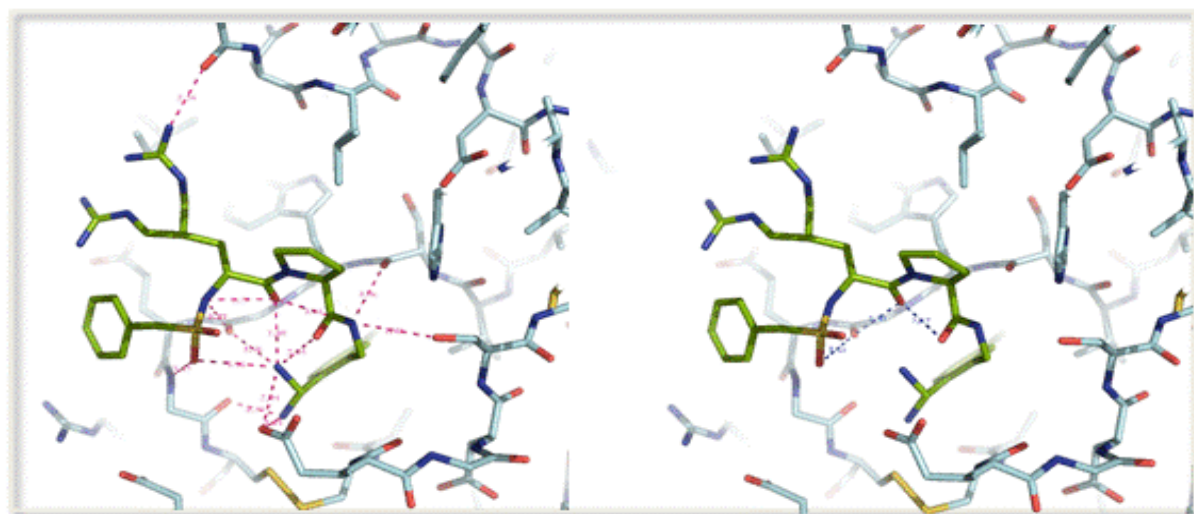


Abbildung 53 Inhibitor MI-0002 (grün) in Komplex mit Thrombin (hellblau). Attraktive Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien in magenta (links), ungünstige Wechselwirkungen in blau (rechts) dargestellt.

Die hydrophobe S3/S4-Tasche in Thrombin scheint also im Gegensatz zu Faktor Xa ungeeignet für die Unterbringung von positiv geladenen Funktionalitäten zu sein. In der mit 70 % besetzten Konformation findet die Guanidinfunktion einen Wasserstoffbrückenpartner oberhalb der S3/S4-Tasche, weiterhin ist eine Wasserstoffbrücke zu dem in der Tasche fixierten Wassermolekül möglich. Die Tatsache, dass die Tasche nicht durch den Liganden besetzt wird, verdeutlicht weiterhin, dass die Unterbringung selbst von

in die Richtung der hydrophoben Tasche orientierten Resten kein Automatismus ist. Scheinbar ist der Prozess der Desolvatisierung der Seitenkette und der Bindetasche insgesamt ein energetisch ungünstiger Prozess, so dass die zur Bindung nötige Einschränkung der Freiheitsgrade in der Seitenkette nicht kompensiert werden kann.

Die hohe Affinität des Inhibitors resultiert höchstwahrscheinlich aus einem optimalen intra- und intermolekularem Wasserstoffbrückennetzwerk im zentralen Teil des Komplexes (**Abbildung 53**). Die nahezu gleich häufig besetzten Konformationen für die Aminomethylgruppe finden ihre Erklärung in der Möglichkeit, entweder Teil des intramolekularen Wasserstoffbrückennetzwerkes zu sein, oder eine salzbrückenartige Wechselwirkung mit Glu 192 auf Seiten des Proteins auszubilden.

Weiterhin ist zu vermuten, dass die beschriebene Konformation des Inhibitors derjenigen des freien Inhibitors in Lösung entspricht, da die *intramolekularen* Wechselwirkungen auch ohne das Protein eingegangen werden sollten. Diese „Präorganisation“ des Inhibitors ist eine weitere mögliche Erklärung für die subnanomolare Affinität.

2.8.3 Der Inhibitor MI-0034

Ebenfalls aus Untersuchungen des Arbeitskreises Steinmetzer [136] entstammt der picomolare Thrombininhibitor MI-0034. Mit dem bekannten Benzamidinanker und dem Prolinbaustein in P2 sind wesentliche Voraussetzungen für eine hohe Affinität gegeben. Weiterhin ist in P3 ein Asparaginsäurerest (in L-Konfiguration) eingebaut, dessen Amidstickstoff in der Seitenkette mit einem 4-Cyanobenzylrest alkyliert ist. Außerdem wurde eine substituierte Phenylsulfonylgruppe über eine Sulfonamidbindung an den N-Terminus des Inhibitors angefügt. Dessen 4-Methoxy- und 3-Chlor-Substituenten sollten zu einer optimalen Ausfüllung der hydrophoben S3/S4-Tasche beitragen.

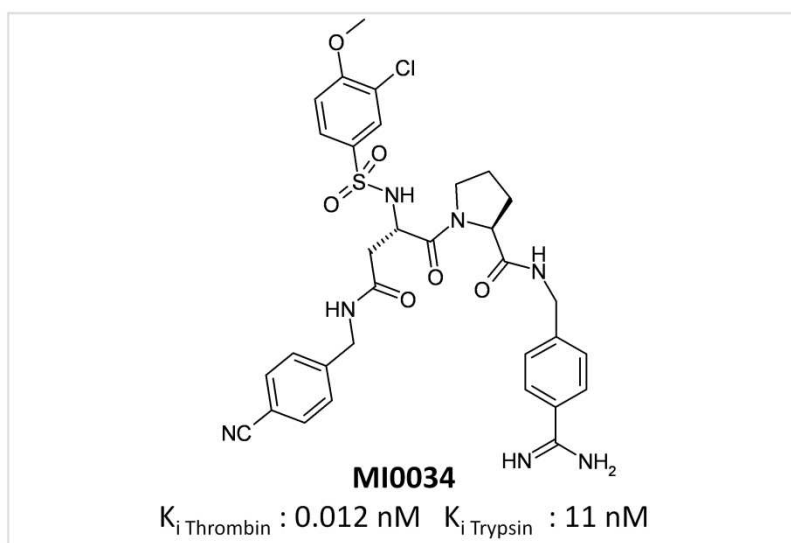


Abbildung 54 Der Inhibitor MI0034

Dieser hochaffine Inhibitor konnte durch *soaking* in Thrombinkristalle eindiffundiert und die Kristallstruktur des Komplexes bis zur Auflösung von 1.55 Å gelöst werden. Für den kompletten Liganden war die Differenzelektronendichte sehr gut definiert, so dass die Koordinaten für alle Atome sicher bestimmt werden konnten.

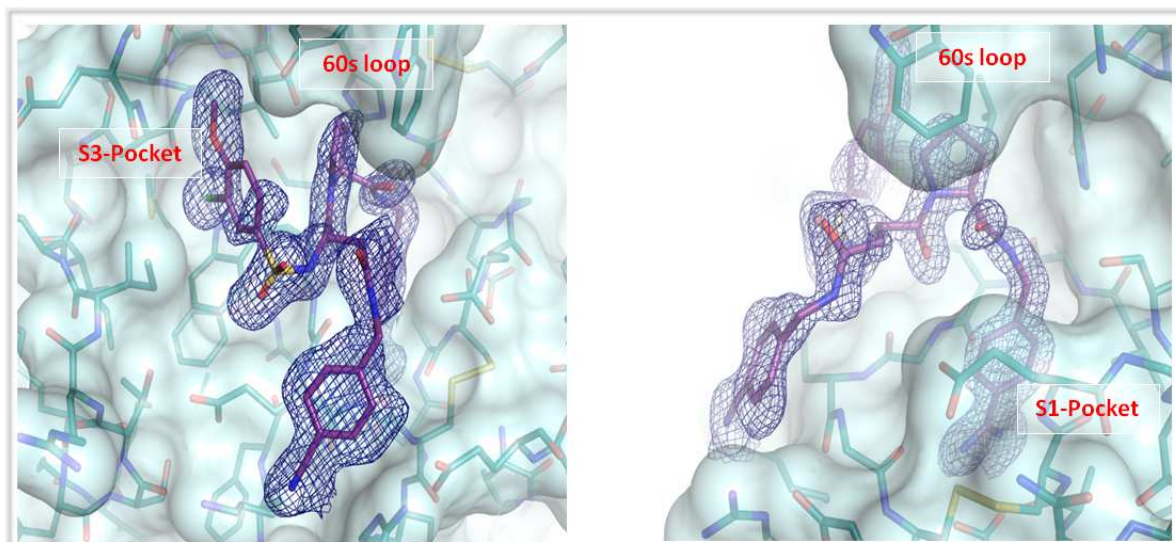


Abbildung 55 Inhibitor MI0034 (violett) in Komplex mit Thrombin (hellblau). Die $F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte für den Inhibitor ist in dunkelblau bei 2σ dargestellt.

Eine genaue Inspektion der Kristallstruktur zeigt, dass das substituierte Phenylsulfonamid, wie erwartet, die S3/S4-Tasche des Enzyms optimal ausfüllt. Der Sauerstoff der Methoxygruppe findet einen Wasserstoffbrückenpartner oberhalb der Tasche, während das Chloratom direkt oberhalb des Tryptophanrestes in der Bindungstasche platziert ist. Diese nicht unbedingt zu erwartende Konformation deutet erneut auf eine attraktive Wechselwirkung eines aromatischen Chloratoms des Liganden mit den π -Elektronen einer aromatischen Aminosäure des Enzyms hin.

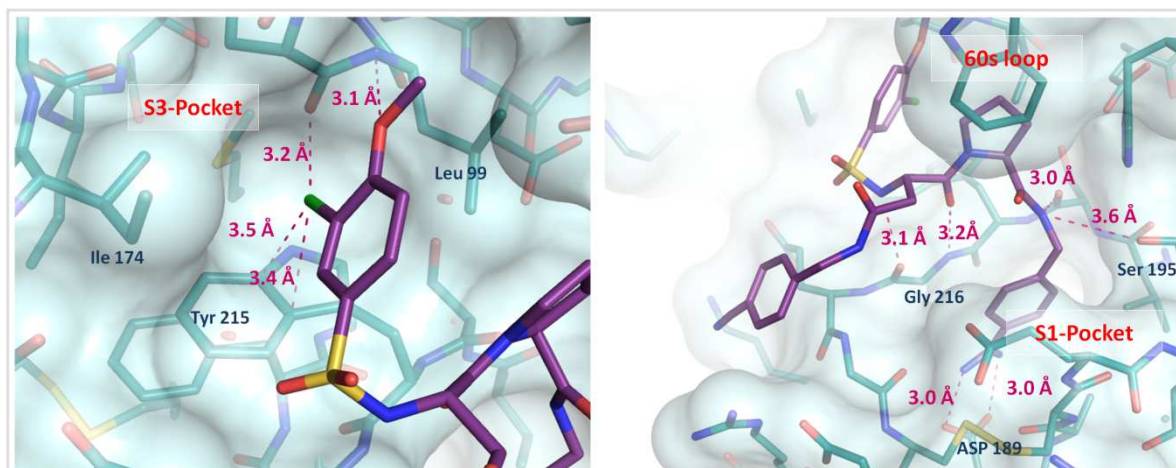


Abbildung 56 Inhibitor MI0034 (violett) im Komplex mit Thrombin (hellblau). Attraktive Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien in magenta dargestellt.

2.9 Isothermale Titrationskalorimetrie mit Ligandengemischen

Aufbauend auf der Arbeit von Jasmine Fokkens [137] wurde untersucht, wie sich Gemische von Inhibitoren bei der Titration im Mikrokalorimeter verhalten und wie die Bindungsisotherme Aufschluss über die Affinität der einzelnen Komponenten geben kann. Diese Fragestellung ist von Relevanz in frühen Phasen der Wirkstoffentwicklung, in denen aus nichtstereoselektiven Synthesen im kleinen Maßstab häufig nur racemische Mischungen von Testsubstanzen zur Verfügung stehen. Da die Affinität zum Zielenzym erheblich von der Konfiguration einzelner funktioneller Gruppen abhängen kann, ist eine Aufschlüsselung in die individuellen Affinitäten der Enantiomere wünschenswert.

Unter der Voraussetzung, dass sich in einem Inhibitorgemisch die Affinitätskonstanten sowie die Bindungsenthalpien zum vorgelegten Zielenzym ausreichend unterscheiden, ergibt sich bei einer Titration im Mikrokalorimeter ein doppelt sigmoidaler Kurvenverlauf.

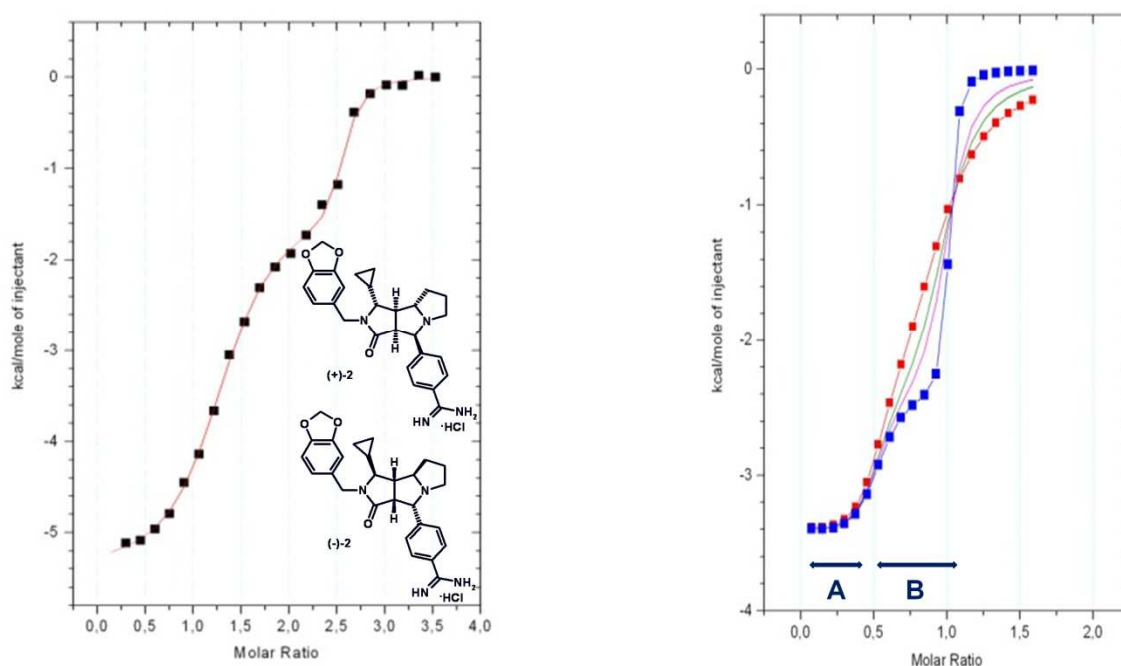


Abbildung 57 ITC mit racemischen Gemischen. *Links:* Experimentell beobachtete Kurve für die Titration eines Enantiomerenpaares in Thrombin für Inhibitor rac-L2. *Rechts:* Simulierte Bindungsisothermen, Erklärung siehe Text.

Abbildung 57 zeigt als Beispiel eine experimentell gemessene Bindungsisotherme für ein Racemat [137], sowie in der Software ORIGIN 5 simulierte Kurven. Zur Simulation wurde ein für Verdrängungstitrationen bekannter *Fitting*-Algorithmus [138, 139] für diesen speziellen Fall variiert, bei dem die Konzentration beider Inhibitoren während der Titration zunimmt

(*SimulDisplace*-Modell). Zu Beginn der Titration binden beide Liganden nahezu vollständig an das Enzym. Da genug Bindungsstellen zur Verfügung stehen, ist diese Phase nichtkompetitiv (**A**). Übersteigt die Gesamtkonzentration der Liganden diejenige des Enzyms, so verdrängt der Ligand höherer Affinität den schwächeren Liganden aus der Bindung (Verdrängungsphase **B**), bis das Enzym vollständig mit dem stärkeren Liganden gesättigt ist und nur noch Verdünnungswärme gemessen wird. Die Abbildung zeigt simulierte Kurvenverläufe für dieses Bindungsmodell in Abhängigkeit vom Verhältnis der Bindungskonstanten. Bindet ein Inhibitor um den Faktor 10 oder 100 stärker an das Zielenzym, so ist kaum Abweichung vom normalen sigmoidalen Kurvenverlauf feststellbar (rote und grüne Kurve). Erst ab einer um den Faktor 200 stärkeren Affinität für einen Liganden ist der Ansatz für ein Plateau erkennbar (violetto Kurve), für den Faktor 1000 in der Affinität ergibt sich eine deutlich zweistufige Kurve (blau). Dieses Ergebnis zeigte sich konstant für diverse absolute Affinitäten und war wenig abhängig von den simulierten Unterschieden in ΔH .

Der Versuch, durch *Fitting* der experimentell erhaltenen Kurven nach dem *SimulDisplace*-Modell die individuellen Bindungsparameter zu erhalten, führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Selbst bei Vorgabe bekannter Affinitäten und Bindungsenthalpien einzelner oder aller Komponenten als Startparameter versagte der beschriebene Algorithmus sinnvolle quantitative Anpassungen zu liefern. Grund ist höchstwahrscheinlich die Tatsache, dass die zu bestimmenden Variablen stark miteinander verknüpft sind und dass die Auflösung der Kurven aus einer begrenzten Zahl von Injektionen zu wenige präzise Datenpunkte und somit keine ausreichende Überbestimmung des anzupassenden Kurvenverlaufs liefert.

Durch Flüssigchromatographie über eine CHIRALPAK®-Säule gelang es der Firma Merck in Darmstadt, die Racemate der Liganden L2, L3, L5 und L7 aus der Dissertation von Jasmine Fokkens [140] aufzutrennen. Die erhaltene Menge der Enantiomere ermöglichte die Bestimmung der Hemmkonstanten durch einen kinetischen *Assay*, reichte aber nicht für eine valide Bestimmung der enthalpischen und entropischen Bindungsparameter durch ITC. Die in **Abbildung 58** aufgeführten K_i -Werte für die Racemate sowie für die einzelnen Enantiomere machen deutlich, dass eine Diskriminierung in der Affinität zu Thrombin nur für die mit einer kleinen Seitenkette substituierten Liganden L2 und L3 erfolgt. In den *R*-konfigurierten Enantiomeren zeigt bei diesen Inhibitoren die Seitenkette in Richtung der kleinen S2-Tasche unter dem *60s-loop*, woraus ein aktivitätssteigernder Beitrag zur Bindungsaffinität resultiert. Die größeren Phenyl- und Benzylseitenketten der Liganden L5 und L7 scheinen für ein Füllen dieser Tasche zu groß zu sein, so dass eine insgesamt schwächere Bindung ohne stereochemische Diskriminierung zu beobachten ist. Dabei ergibt sich für das Enantiomerenpaar *rac*-L2 ein Verhältnis in der Bindungsaffinität von ungefähr 60. Obwohl für dieses Verhältnis der K_i -Werte kein doppeltsigmoidaler Kurvenverlauf simuliert werden konnte, ergibt sich im realen Experiment eine Bindungsisotherme mit

einem deutlichen Plateau (**Abbildung 57**, links). Dies spricht erneut dafür, dass das zur Simulation verwendete *SimulDisplace*-Modell nicht die mikrokalorimetrisch zu messenden Wärmemengen wiedergibt.

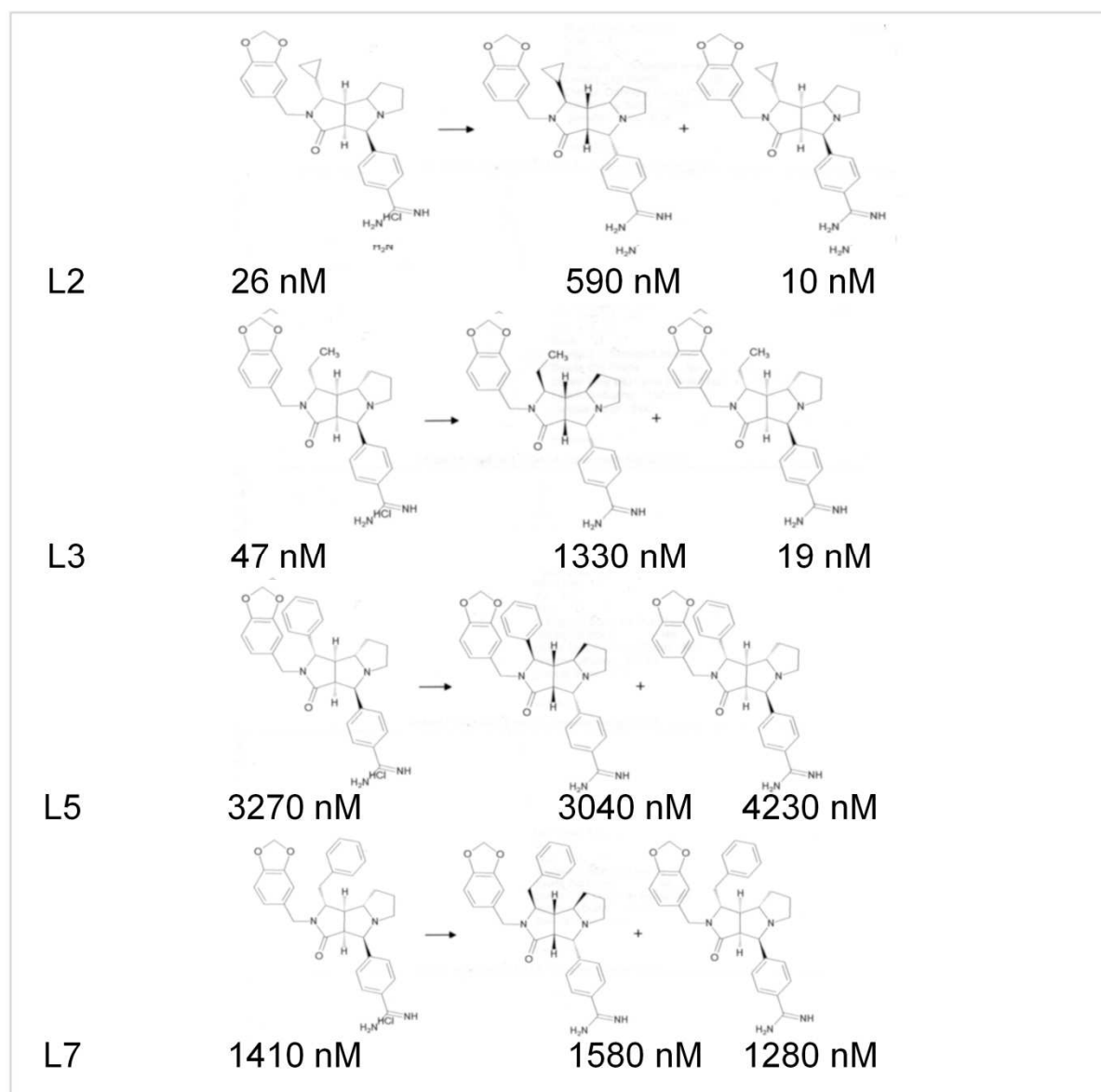


Abbildung 58 Kinetisch gemessene Affinitätskonstanten K_i für Racemate und einzelne Enantiomere aus einer Serie von Thrombinhemmstoffen

Inzwischen ist es der Firma Microcal als Hersteller von Mikrokalorimetern gelungen, gut aufgelöste doppelstufige Titrationskurven für die Titration von Calcium- und Bariumionen in eine EDTA-Lösung zu erhalten und daraus die Bindungsaffinität und den enthalpischen Beitrag korrekt zu berechnen [141]. Auch wenn dieses Modellsystem nicht annähernd an die Komplexität einer Protein-Ligand-Wechselwirkung heran kommt, belegt es doch

grundsätzlich die Möglichkeit für bestimmte Fälle die gewünschte Auswertung vorzunehmen, so dass weitere Experimente mit Enzymlösungen durchgeführt wurden.

Die Wahl fiel aus praktischen Gründen auf Trypsin als Modell-*Target*, da das Enzym günstig zu erwerben und ohne vorherige Dialyse zu verwenden ist. Als Modell für ein Racemat wurde dabei ein Gemisch aus UB_THR_32 ($K_d = 0.047 \cdot 10^6 \text{ mol/l}$, $\Delta H^0 = -8100 \text{ cal/mol}$, eigene Messung) und *n*-pentyl-Benzamidin ($K_d = 17 \cdot 10^6 \text{ mol/l}$, $\Delta H^0 = -1600 \text{ cal/mol}$)[104] gewählt, da sich beide Inhibitoren deutlich sowohl in ihrer Bindungsaffinität als auch in ihrem enthalpischen Bindungsbeitrag unterscheiden und in ausreichender Menge zur Verfügung standen. **Abbildung 59** zeigt links, dass bei Titration einer 3 mM Lösung des Gemisches in eine 0.2 mM Trypsinlösung eine doppelsigmoidale Kurve erhalten werden konnte. In der Abbildung rechts wurde versucht, die Messpunkte mit einer dem kompetitiven Bindungsmodell entsprechenden Kurve zu verbinden. Während dies für die Verdrängungsphase gut gelang, ergeben sich deutliche Abweichungen für die erste Hälfte der Bindungsisotherme. Über Gründe hierfür kann nur spekuliert werden, neben einer überlagerten Autodigestion des Enzyms können weitere unspezifische Bindungsereignisse in den hochkonzentrierten Lösungen die Reaktionswärme beeinflussen.

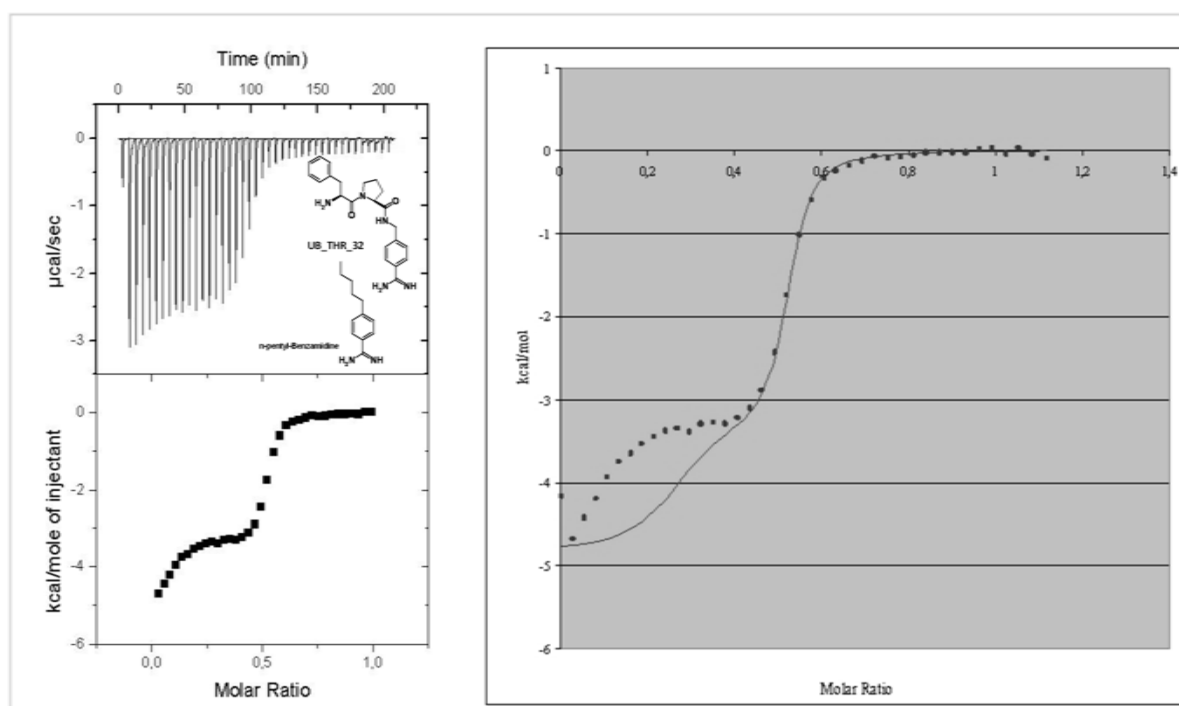


Abbildung 59 ITC mit einem Inhibitorgemisch. *Links:* Experimentell beobachtete Kurve für die Titration in Trypsin. *Rechts:* Der Versuch des Kurvenfittings gelingt nur unvollständig unter Vorgabe der bekannten Bindungsparameter.

Für weitere Untersuchungen wurde ein Enantiomerenpaar gewählt, das als FaktorXa-Inhibitor entworfen wurde [67] und enantioselektive Affinität zu Trypsin aufweist (**Abbildung 60**). Die Titration der getrennten Enantiomere zeigte, dass für beide auch ein deutlicher

Unterschied im enthalpischen Bindungsbeitrag besteht. Allerdings mussten diese Titrations aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinität bei verschiedenen Enzym- und Inhibitorkonzentrationen durchgeführt werden. Die Wahl der experimentellen Bedingungen für die Titration des Racemats fiel zunächst auf eine mittlere Trypsinkonzentration von 0.1 mM, wobei sich kein doppeltsigmoidaler Kurvenverlauf zeigte (**Abbildung 60**). Die weiterhin abgebildeten Titrationskurven für variierte Konzentrationen und Injektionsvolumina zeigt eine starke Abhängigkeit des Kurvenverlaufs von den experimentellen Bedingungen. Für keine Kurve konnte eine Bindungsisotherme gefunden werden, die dem *SimulDisplace*-Modell entspricht.

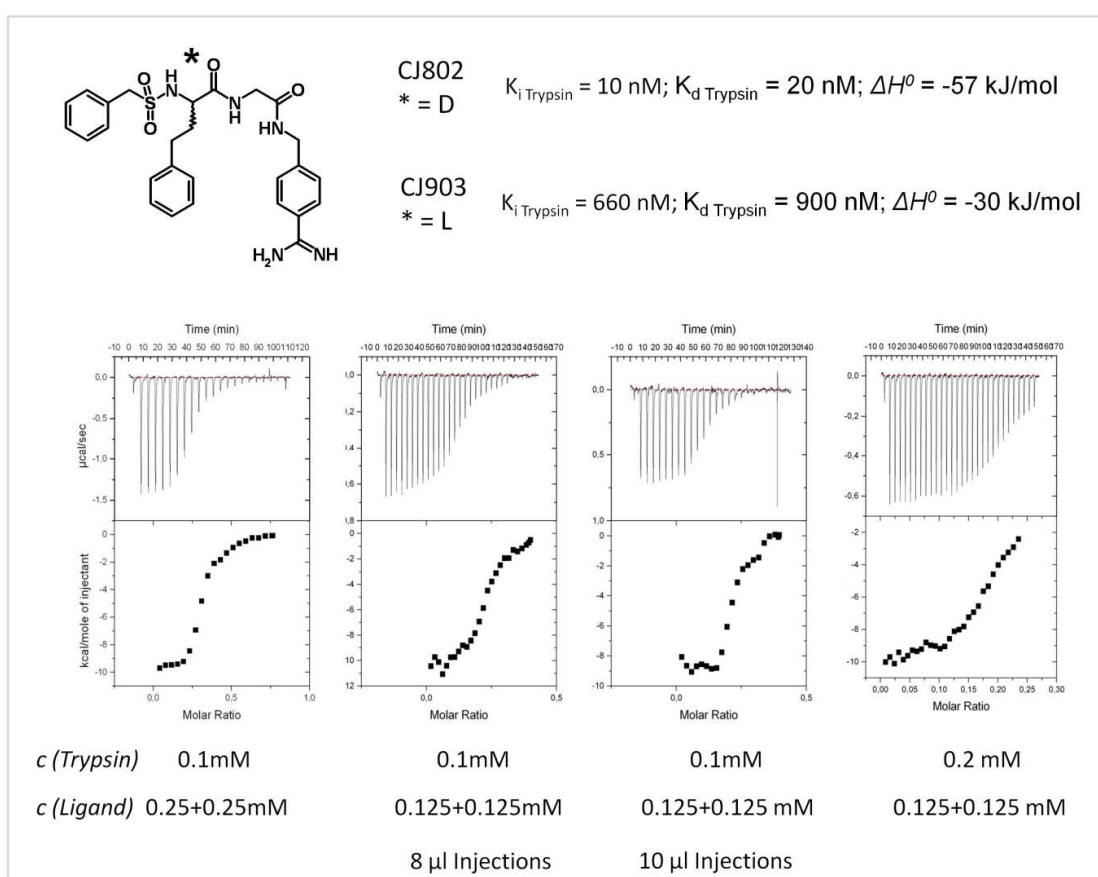


Abbildung 60 Titration eines Gemisches aus CJ802 und CJ903 in Trypsin bei verschiedenen experimentellen Bedingungen

Die gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die enantioselektive Erkennung der Komponenten eines Racemats sich zwar in der Bindungsisotherme eines ITC-Experiments bemerkbar macht, eine Auswertung zur Bestimmung der individuellen Affinitäten aber mit dem *SimulDisplace*-Modell bisher nicht möglich ist. Weiterhin wurde beobachtet, dass der Kurvenverlauf stark von den experimentellen Bedingungen wie Konzentration und Injektionsvolumen abhängt. Zusätzlich ist noch eine Abhängigkeit von der Temperatur und dem verwendeten Puffer zu erwarten. Daher scheint die Optimierung der idealen

experimentellen Messbedingungen ein multidimensionales Problem zu sein, das die Anwendbarkeit des Verfahrens für Routineuntersuchungen im *Screening* einschränkt. Ist für ein Racemat die Auftrennung in die Enantiomere mit zu großem Aufwand verbunden, so kann über ITC aber zumindest entschieden werden, *ob* eine diskriminierende Bindung der Enantiomere an das Target erfolgt, und aus dem Kurvenverlauf kann das ungefähre Verhältnis der Affinitäten abgeschätzt werden.

3 Summary and perspective

The presented study contributes to the fundamental understanding of molecular recognition of small molecules by a macromolecular host protein. The biophysical properties of a large set of systematically varied thrombin inhibitors were anatomized in detail. In particular the combination of structural information from X-ray crystallography with thermodynamic data from microcalorimetry allowed following the thermodynamically relevant differences resulting in the binding process. The approach of systematically varying biophysical properties of protein inhibitors in small steps permits conclusive statements on the contribution of individual functionalities to binding affinity, as the outstanding complexity of the binding thermodynamics could be reduced to the comparison of closely related inhibitors. Reorganization of solute molecules was explicitly considered in all discussions of the factors determining the widely varying binding affinity of the inhibitors to their target.

A reference state of uncomplexed thrombin was generated by high-resolution X-ray crystallography, revealing the hydration pattern of the active site before inhibitor binding (Chapter 2.1).

Convincing correlation of the data from two independent methods to measure binding affinity showed good correspondance (Chapter 2.2.1.), which assured correctness of the determined affinity data. The role of enthalpy-/entropy-compensation was discussed for the complete set of inhibitors (chapter 2.3.), though not allowing any conclusion neither on linear nor non-linear interrelation between both entities.

A focus on the S1 pocket of thrombin (chapter 2.4.) gave a conclusive picture of all thermodynamically relevant factors for the binding of neutral residues into the binding pocket which was for a long time rather dogmatically assumed to be “made” to recognize basic side chains only. A reasonable explanation for the surprisingly high potency, mainly of enthalpic nature, of *m*-chloro-benzylamides was found in their low desolvation energy and the electrostatically favorable chlorine- π interaction with Tyr 228. By evaluating the crystallographically determined temperature factors, the consequence for firmly fixed inhibitors with respect to their residual entropy was demonstrated. Thus, the impact of desolvation, untypical electrostatic interaction and residual entropy for binding affinity was reemphasized.

Furthermore, the tight binding of bis-phenyl methane thrombin inhibitors could be explained (chapter 2.5.). The two phenyl rings contribute to binding affinity for different reasons. Whereas the first one occupies the hydrophobic S3 pocket, resulting in a classical hydrophobic effect, the second phenyl ring causes rearrangement of Glu 217 and thus the strengthening of a salt-bridge to Lys 224.

A detailed discussion of superimposed protonation effects in inhibitor binding has been provided (chapter 2.5) by direct comparison of the buffer dependencies of ΔH_{bind}^0 for a subset of

the inhibitor series. The data reveal a virtually, in terms of heat, compensating effect of proton release by histidine 57 and uptake by the inhibitors featuring a basic primary amino group.

Evidence for the occurrence of cooperativity effects among single interactions was provided by investigations focusing on the S3/S4 pocket of thrombin (chapter 2.6.). The strength of the hydrophobic interaction in this pocket depends on the presence of an additional hydrogen bond formed to the enzyme at the entrance of this pocket. This reinforcement can be explained by a reduced enthalpy-/entropy-compensation as a consequence of the introduced additional attractive contacts between inhibitor and protein. This is particularly evident in the cases of inhibitors that are already rather firmly fixed in the binding pocket with and without this additional hydrogen bond at the rim of this pocket. Experimentally this could be demonstrated by evaluating the temperature factors of inhibitors from six well resolved crystal structures, which correlated with the thermodynamic data from microcalorimetry in terms of an "entropic penalty" that has to be paid upon introduction of this additional hydrogen bond.

Crystal structures of two additional highly potent subnanomolar thrombin inhibitors revealed that shape complementary of the inhibitor to the enzyme, in particular filling the S3 pocket of thrombin, is not an inevitable precondition for very tight binding to the enzyme (chapter 2.8.2.). Optimal interaction of the inhibitor's core fragment with the central residues of the active site seems to be rather the substantial prerequisite for high binding affinity (chapter 2.8). Furthermore, the effect of a proper preorganization of the ligands appears as another important prerequisite to high affinity binding. A second example for an attractive chlorine- π interaction was found for a chloro-substituted phenyl ring in the S3 pocket of thrombin (chapter 2.8.3.).

The derived knowledge about the fine details that govern binding affinity has subsequently to be used to improve the predictive power to precisely estimate the free energy of binding. The development of sophisticated scoring functions that do not falsely ignore desolvation energies, the influence of residual entropy and cooperative effects is still challenging but any improvement will promote the success of virtual screening campaigns or serve as important prerequisite for predictive *de-novo* drug design. Simulations of the molecular dynamics of the investigated inhibitor series, using the determined crystal structures as a reliable starting geometry, can further contribute to the understanding of the conformational restrictions that are experienced by the inhibitors - and amino acid residues present in the protein - upon complex formation. These calculations would require a force field which correctly reflects the electrostatic interactions of the uncharged *m*-chloro-benzylamides with the S1 pocket of thrombin. Evaluation of the trajectory from the MD simulations can be used to calculate entropy changes associated with the binding event. The complete data of experimentally derived entropies may provide a profitable set for the validation of entropy calcula-

tions. Furthermore, NMR relaxation methods may provide perspectives to determine the dynamic properties and to measure entropy contributions.

The attractive force provided by the chlorine- π interaction should be evidenced by replacing Tyr 228 in a thrombin mutant by a non-aromatic hydrophobic amino acid such as isoleucine. Further mutants would have to be generated, in order to demonstrate whether this attraction is unique for thrombin or trypsin-like serine proteases with an aromatic residue at its far end.

Further basic investigations will have to be done including other types of protein-ligand interactions such as the complexation via metal ions. Thermolysin might be an attractive target for elucidating cooperative effects between hydrophobic interaction and the coordination of the catalytic zinc ion. Additionally, medicinal chemistry needs further basic research to elucidate the influence of a bound cofactor or of pronounced conformational changes experienced by protein, which luckily could be neglected in the presented study of thrombin.

4 Experimental Part

4.1 Kinetic Assay

Kinetic inhibition of human thrombin (from Beriplast[®], CSL Behring, Marburg, Germany) was determined photometrically at 405 nm using the chromogenic substrate Pefachrom tPa (LoxoGmbH, Dossenheim, Germany) according to the protocols described by Stürzebecher et. al.[142] under the following conditions: 50mM Tris/HCl, pH 7.4, 154mM NaCl, 5% DMSO, 0.1% PEG 8000 at 25°C using different concentrations of substrate (182 µM, 91 µM and 45µM) and inhibitor (36.4, 27.3, 18.2 and 9.1 µM for the weakest inhibitor and 3.6, 2.7, 1.8 and 0.9 nM for the tightest binder). Activity of thrombin was adjusted by diluting (appr. 1:300) a 50µg/ml solution with 154 mM NaCl until linear conversion of the substrate could be detected over 5 min in an appropriate absorption window (appr. 0.2 -0.8). The assay was stopped after 3 min with concentrated acetic acid and absorption in each well was corrected for the blank value. K_i -values ($n \geq 3$) were determined as described by Dixon.[143]

4.2 Microcalorimetry (ITC)

ITC experiments were carried out using an MCS titration calorimeter (Wiseman et al. 1989) (Microcal, Inc., Northhampton, MA, USA). Concentrations of inhibitor stock solutions in DMSO were determined by weight of the corresponding hydrochlorides. Final concentration was achieved by diluting 1:40 in the experimental buffer. Protein solution was freshly prepared for each experiment by dialysis of a thrombin sample (from Beriplast[®], CSL Behring, Marburg, Germany) in the experimental buffer and final adjustment of DMSO concentration to 2.5%. ITC measurements were routinely performed at 25°C in 50 mM TRIS/HCl, pH7.8, 100mM NaCl, 2,5% DMSO, 0.1% PEG 8000. Inhibitor solutions (concentration in the range 0.03–0.25mM, depending on the specific ligand) were degassed (approx. 10min) prior to use and titrated into the stirred cell (1.3513 ml) containing thrombin solution (0.006-0.02mM) after a stable baseline had been achieved. The injection sequence consisted of an initial injection of 1.5 µl to prevent artefacts arising from the filling of the syringe (not used in data fitting), followed by injection of 7-12µl each at 300s intervals until complete saturation of the enzyme binding sites was achieved. Raw data were collected and the area under each peak was integrated, followed by correction for heats of dilution and mixing by subtracting the final baseline consisting of small peaks of the same size to zero. Data were analysed using ORIGIN Software (Microcal Inc.), by fitting a single-site binding isotherm (Wiseman et al. 1989) that yields ΔH_{bind}^0 (enthalpy of binding) and K_D (dissociation constant). Measurements were performed at least in duplicate; K_D was reproducible to within 10% and ΔH_{bind}^0 was reproducible to within 5%. **Abbildung 61** exemplarily shows binding isotherms for the titra-

tion of **UB_THR_19** (a), **UB_THR_29** (b) and **UBTHR_33** (c). The curve for the weak binding inhibitor (a) reemphasizes the difficulties in reliable determination of ΔH^0_{bind} due to deviation from sigmoidal shape. The titrations recorded for the demonstrated inhibitors cut the upper and lower limit of affinities that can be determined by ITC. Nonetheless, it was relinquished to perform replacement titrations which would introduce more uncertainty and reduce comparability.

Buffer dependence of ΔH^0_{bind} was tested for **UB_THR 32, 33, 64** and **91** in TRIS, HEPES, TRICINE and pyrophosphate buffer, respectively. Despite different enthalpies of ionization for the buffers, only marginal differences in ΔH^0 were observed for the first three inhibitors not exceeding the accuracy limits of experiment. The net proton exchange for complex formation could be calculated to -0.04, -0.14 and -0.09 (**Figure 36**), which is below the threshold for which overlaying protonation steps should be discussed. For **UB_THR_91**, a net proton exchange of -0.56 protons was determined

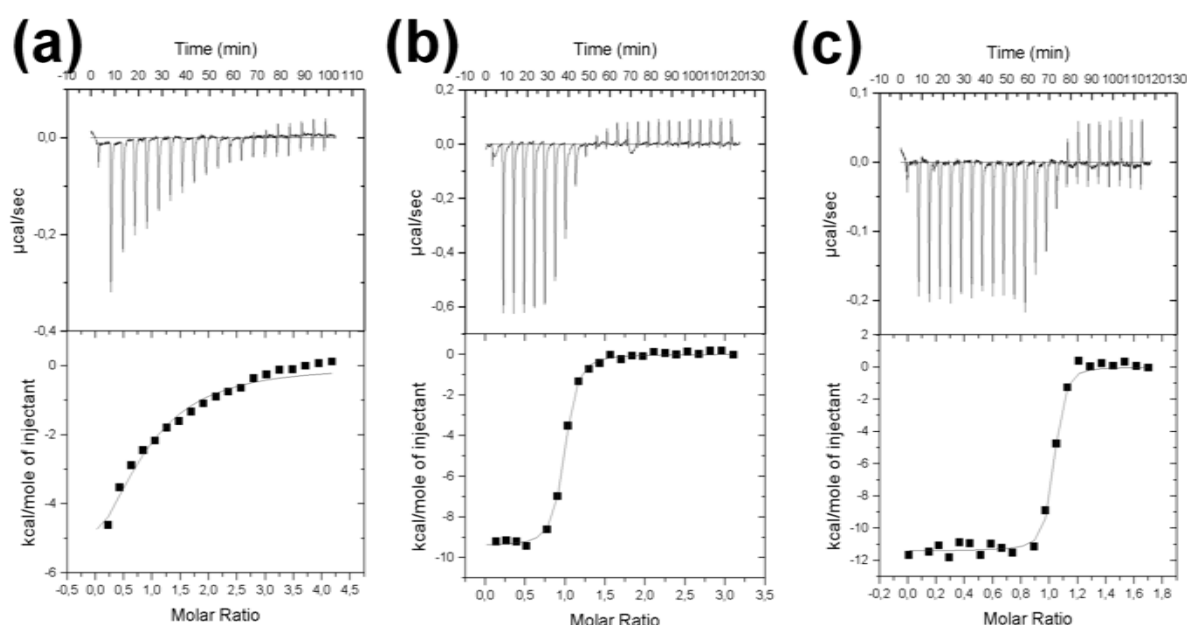
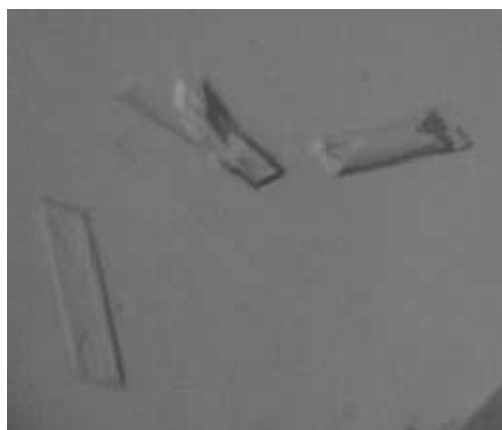


Abbildung 61 Representative titration curves for **UB_THR_19** (a), **UB_THR_29** (b) and **UBTHR_33** (c)

4.3 Crystallography

Crystallisation and Soaking

Human α -thrombin (from Beriplast[®], CSL Behring, Marburg, Germany) was dissolved in crystallisation buffer (100 mM sodium phosphate buffer, 350 mM sodium chloride and 10 mM benzamidine, pH 7.5) and after dialysis against the same buffer the sample was concentrated to 5 mg/ml. 200 μ l of this solution were mixed with 20 μ l of an aqueous solution (500 mg/ml) of Hirugen (Bachem, Bubendorf, Switzerland). After an incubation time of 10 hours, crystallisation was carried out at 4° C by vapour diffusion method in a hanging drop using 28 % polyethylene glycol 8000 and 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). After an equilibration period of 16 hours, a microseeding was performed. For soaking, a mixture of 25% 10–40 mM solution of inhibitors in DMSO and 75% crystallisation buffer was prepared, in which medium sized crystals without visible imperfections were soaked for 6–24 hours.



Data Collection and Processing

Crystals were prepared for data collection at 110 K using a cryoprotectant solution of 20% glycerol (w/v) in crystallisation buffer. The datasets for **3**, **5** and **6** were collected with synchrotron radiation at BESSY beamlines 14.1 and 14.2 on Marmosaic 225 mm CCD or Mar CCD 165mm detector, respectively. Diffraction data for **2** were collected at DESY beamline X13 on Mar CCD 165 mm detector. Diffraction data for **1** and **4** were collected on RIGAKU copper rotating anode at 50 kV, 90 mA using an R-Axis IV++ image plate system. Data processing and scaling were performed using the HKL2000 package.[144]

Structure determination and refinement

The coordinates of human thrombin (PDB Code 1H8D) [145] were used for initial rigid body refinement of the protein molecules followed by repeated cycles of conjugate gradient energy minimisation, simulated annealing and B-factor refinement using the CNS program package [146]. Refinement at later stages was performed with the program SHELXL [147]. Here, at least 20 cycles of conjugate gradient minimisation were performed with default restraints on bonding geometry and *B*-values. Five percent of all data were used for R_{free} calculation. Amino acid side-chains were fitted into sigma-weighted $2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$ electron density maps using Coot [148]. After the first refinement cycle, water molecules and subsequently ions and ligand were located in the electron density and added to the model. Restraints were applied to bond lengths and angles, chiral volume, planarity of aromatic rings and van der Waals contacts. Multiple side-chain conformations were built in case an appropriate electron density was observed and maintained during the refinement, and if the minor populated side-chain showed at least 10% occupancy. During the last refinement cycles, riding H-atoms were introduced without additional parameters. The final models were validated using PROCHECK [149]. In the complex of **UB_THR_91**, the geometry of the terminal acetyl group suffers from a less-well defined electron density leading to enhanced *B*-factors. Data collection, unit cell parameters and refinement statistics are given in the crystallographic table. Analysis of temperature factors was executed with Moleman [150], distances and angles were measured in SYBYL 8.0 (TriposInc., USA). Figures were prepared using Isis Draw (MDL, San Leandro, USA) and Pymol 0.99 (DeLano Scientific, USA). Van der Waal contacts (threshold below 4.33 Å) were assigned with the program CONTACTSYM [151, 152]. For this purpose, the rather unconstrained amino acid Glu 192, which was partially refined in a double conformation, has been neglected to assure comparability among the structures. Coordinates and structure factors of all X-ray structures have been deposited in the Protein Data Bank, the accession codes are listed in the following crystallographic table.

4.3.1 Crystallographic table

Footnotes for the following Crystallographic table:

* Numbers in parenthesis characterize the highest resolution shell

¹ Amino Acids of the Binding Site (distance 3 Å from Inhibitor): His57, Tyr60A, Pro60C, Trp60D, Glu97A, Asn98, Leu99, Asp102, Ile174, Asp189, Ala190, Cys191, Asp194, Ser195, Val213, Ser214, Trp215, Gly216, Glu217, Gly219, Cys220, Gly226, Phe227, Tyr228

² B factor for additional water above Tyr228: 6.8 Å²

³ B factor for additional water above Tyr228: 35.9 Å²

Complex PDB entry	THR-<i>apo</i> 3D49	THR-<i>UB19</i> 2ZFP	THR-<i>UB21</i> 2ZGB	THR-<i>UB22</i> 2ZC9	THR-<i>UB23</i> 3DHK
Data collection and processing					
No. of crystals used	1	1	1	1	1
Wavelength [Å]	0.91841	1.54178	0.91841	0.97803	0.91841
Space group	C2	C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters					
a, b, c [Å]	70.4, 71.5, 72.5	70.5, 71.3, 72.9	69.8, 71.4, 72.6	70.4, 71.3, 72.9	70.0, 71.3, 72.4
β [°]	100.4	100.6	100.3	100.7	100.3
Matthews coefficient [Å ³ /Da]	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Solvent content [%]	47	48	46	47	45
Diffraction data*					
Resolution range [Å]	20 – 1.50 (1.53 – 1.50)	20 – 2.25 (2.29 – 2.25)	20 – 1.60 (1.63 – 1.60)	30 – 1.58 (1.61 – 1.58)	30 – 1.73 (1.76 – 1.73)
Unique reflections	54 430 (2419)	15 884 (786)	45 709 (2 273)	46 641 (1 725)	33 387 (1 684)
R(I) _{sym} [%]	3.4 (17.6)	8.2 (31.7)	3.5 (31.9)	3.4 (23.5)	4.9 (38.8)
Completeness [%]	97.0 (86.8)	93.8 (90.3)	99.5 (100)	95.9 (71.1)	91.2 (92.1)
Redundancy	2.9 (2.7)	2.2 (2.0)	3.2 (3.1)	2.2 (1.7)	2.0 (1.9)
I/σ(I)	29.7 (4.9)	12.1 (2.8)	29.5 (3.9)	24.9 (3.4)	14.3 (2.3)

Refinement					
Resolution range [Å]	10 – 1.50	10 – 2.25	10 – 1.60	10 – 1.58	10 – 1.73
Reflections used in refinement (work/free)	53 163 / 2702	14 832 / 709	43 780 / 2187	42 070 / 2197	31 778 / 1 592
Final R values for all reflections (work/free) [%]	20.2 / 28.5	17.6 / 29.8	19.3 / 23.1	18.01 / 23.3	19.7 / 24.9
Final R values for reflections with $F > 4 \sigma F$ (work/free) [%]	19.8 / 23.7	15.4 / 26.3	18.6 / 22.2	17.1 / 22.0	17.6 / 23.1
Protein residues	250	251	251	251	249
Sodium Ions	2	2	2	2	2
Inhibitor Atoms	-	22	24	27	33
Water molecules	190	142	185	271	126
RMSDs					
Bonds [Å]	0.011	0.005	0.009	0.010	0.007
Angles [°]	2.8	2.0	2.5	2.6	2.3
Ramachandran plot					
Residues in most favoured regions [%]	85.9	86.0	84.6	86.1	86.5
Residues in additional allowed regions [%]	13.7	13.0	14.9	13.4	13.0
Residues in generously allowed regions [%]	0.4	1.0	0.4	0.5	0.5
Mean B factor [Å²]					
Protein	21.4	23.8	23.2	20.7	21.5
Inhibitor	-	23.0	21.4	15.7	18.7
Water molecules	28.4	28.1	29.9	31.2	25.7
Binding Site ¹				14.9	

Complex PDB entry	THR-UB24 2ZI2	THR-UB26 2ZIQ	THR-UB27 2ZHQ	THR-UB29 2ZGX	THR-UB31 2ZNK
Data collection and processing					
No. of crystals used	1	1	1	1	1
Wavelength [Å]	0.91841	0.91841	1.54178	1.54178	0.91841
Space group	C2	C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters					
a, b, c [Å]	70.5, 71.6, 72.6	70.2, 71.6, 72.3	70.1, 71.4, 72.9	70.4, 71.5, 72.5	70.2, 71.6, 72.5
β [°]	100.6	100.3	100.8	100.7	100.5
Matthews coefficient [Å ³ /Da]	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Solvent content [%]	47	46	46	47	46
Diffraction data*					
Resolution range [Å]	20 – 1.65 (1.68 – 1.65)	20 – 1.65 (1.68 – 1.65)	20 – 1.96 (2.01 – 1.96)	20 – 1.80 (1.83 – 1.80)	20 – 1.80 (1.83 – 1.80)
Unique reflections	41 212 (1 681)	41 871 (1 963)	24 126 (1 668)	32 453 (1 558)	32 354 (1 535)
R(I) _{sym} [%]	3.2 (23.8)	4.2 (23.3)	7.2 (25.7)	4.8 (32.6)	2.8 (9.1)
Completeness [%]	96.5 (77.8)	98.6 (91.0)	93.7 (96.7)	99.1 (96.2)	98.8 (95.1)
Redundancy	2.0 (1.7)	2.8 (2.3)	2.8 (2.7)	2.5 (2.4)	2.7 (2.4)
I/σ(I)	20.8 (2.5)	24.2 (3.5)	12.6 (2.8)	20.7 (2.5)	29.4 (6.0)

Refinement					
Resolution range [Å]	10 – 1.65	10 – 1.65	10 – 1.96	10 – 1.80	10 – 1.80
Reflections used in refinement (work/free)	39 496 / 1 973	40 527 / 2 022	22 286 / 1 070	31 065 / 1 536	31 481 / 1 536
Final R values for all reflections (work/free) [%]	18.2 / 22.5	18.1 / 22.5	19.3 / 27.2	17.8 / 22.9	17.9 / 22.9
Final R values for reflections with $F > 4 \sigma F$ (work/free) [%]	17.1 / 21.2	17.3 / 21.3	17.7 / 25.4	16.6 / 21.5	17.4 / 21.9
Protein residues	252	252	251	250	251
Sodium Ions	2	2	2	2	2
Inhibitor Atoms	23	25	28	24	26
Water molecules	192	179	154	194	220
RMSDs					
Bonds [Å]	0.009	0.009	0.006	0.008	0.008
Angles [°]	2.6	2.5	2.1	2.4	2.5
Ramachandran plot					
Residues in most favoured regions [%]	85.5	84.0	85.2	86.5	85.2
Residues in additional allowed regions [%]	14.0	15.6	14.8	13.0	14.3
Residues in generously allowed regions [%]	0.4	0.4	-	0.5	0.4
Mean B factor [Å²]					
Protein	19.5	21.7	20.1	21.6	19.6
Inhibitor	23.6	21.9	18.5	18.2	17.2
Water molecules	27.7	28.6	25.7	27.9	27.4

Complex PDB entry	THR- UB32 2ZDA	THR- UB33 2ZO3	THR- UB37 2ZDV	THR- UB51 2ZF0	THR- UB53 2ZFF
Data collection and processing					
No. of crystals used	1	1	1	1	1
Wavelength [Å]	0.91841	0.91841	0.97803	0.80150	0.95373
Space group	C2	C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters					
a, b, c [Å]	70.3, 71.5, 72.4	70.0, 71.6, 72.0	70.5, 71.4, 72.8	70.0, 71.3, 72.5	70.1, 71.5, 72.5
β [°]	100.5	100.1	100.6	101.1	100.3
Matthews coefficient [Å ³ /Da]	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Solvent content [%]	46	46	47	46	46
Diffraction data*					
Resolution range [Å]	20 – 1.73 (1.76 – 1.73)	20 – 1.70 (1.73 – 1.70)	25 – 1.72 (1.78 – 1.72)	50 – 2.20 (2.25 – 2.20)	20 – 1.47 (1.50 – 1.47)
Unique reflections	35 607 (1 692)	34 569 (1 706)	37 058 (3 536)	16 506 (819)	58 620 (2 837)
R(I) _{sym} [%]	9.0 (25.2)	2.9 (23.5)	5.3 (16.9)	4.6 (16.6)	3.6 (49.9)
Completeness [%]	97.6 (93.1)	97.8 (96.7)	98.4 (94.8)	91.2 (69.1)	98.1 (96.7)
Redundancy	2.9 (2.2)	2.9 (2.8)	2.9 (2.3)	2.9 (2.5)	2.6 (2.6)
I/σ(I)	14.8 (3.3)	26.7 (2.8)	27.5 (3.6)	18.7 (6.1)	27.8 (2.6)

Refinement					
Resolution range [Å]	10 – 1.73	10 – 1.70	10 – 1.72	10 – 2.20	10 – 1.47
Reflections used in refinement (work/free)	32 402 / 1 691	34 569 / 1 706	33 538 / 1 776	15 099 / 775	52 843 / 2 814
Final R values for all reflections (work/free) [%]	17.2 / 22.8	18.7 / 25.0	18.7 / 24.3	17.0 / 26.7	14.6 / 20.3
Final R values for reflections with $F > 4 \sigma F$ (work/free) [%]	16.9 / 21.4	17.8 / 23.6	17.9 / 23.0	16.1 / 25.2	14.0 / 19.3
Protein residues	252	250	251	252	252
Sodium Ions	2	2	2	2	2
Inhibitor Atoms	29	35	27	27	26
Water molecules	268	195	295	174	159
RMSDs					
Bonds [Å]	0.008	0.008	0.008	0.005	0.010
Angles [°]	2.5	2.5	2.6	2.1	2.9
Ramachandran plot					
Residues in most favoured regions [%]	86.6	88.1	85.5	85.6	86.6
Residues in additional allowed regions [%]	13.4	11.4	14.0	13.4	12.9
Residues in generously allowed regions [%]	-	0.5	0.5	1.0	0.5
Mean B factor [Å²]					
Protein	17.1	20.7	20.6	20.6	23.9
Inhibitor	11.4	18.0	18.8	15.1	26.2
Water molecules	26.7 ²	28.1	34.9	25.8	30.4 ³
Binding Site ¹	10.9		14.5	14.2	18.9

Complex PDB entry	THR-UB64 3DUX	THR-UB91 3F68	THR-MM18 3EGK	THR-MI0002 3EQ0	THR-MI0008 -
Data collection and processing					
No. of crystals used	1	1	1	1	1
Wavelength [Å]	0.91841	0.933	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	C2	C2	C2	C2	C2
Unit cell parameters					
a, b, c [Å]	70.0, 71.4, 72.8	70.3, 72.0, 72.5	70.2, 71.4, 72.6	70.1, 71.4, 72.4	70.8, 71.4, 72.4
β [°]	100.5	100.1	100.5	100.4	100.7
Matthews coefficient [Å ³ /Da]	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Solvent content [%]	46	47	46	46	47
Diffraction data*					
Resolution range [Å]	30 – 1.60 (1.63 – 1.60)	29 – 1.75 (1.85 – 1.75)	50 – 2.20 (2.24 – 2.20)	30 – 1.53 (1.56 – 1.53)	30 – 1.55 (1.58 – 1.55)
Unique reflections	43 781 (2 281)	85 355 (11 620)	16 995 (854)	49 919 (2616)	47 623 (2 488)
R(I) _{sym} [%]	4.3 (45.2)	6.4 (70.7)	10.3 (44.1)	3.9 (49.1)	4.6 (32.3)
Completeness [%]	94.0 (98.2)	98.5 (98.1)	94.1 (96.2)	94.5 (97.9)	92.7 (96.5)
Redundancy	2.5 (2.4)	2.4 (2.3)	2.2 (2.1)	2.5 (2.5)	2.5 (2.4)
I/ σ (I)	22.4 (2.3)	11.7 (1.2)	9.8 (2.5)	26.6 (2.1)	17.0 (2.6)

Refinement					
Resolution range [Å]	10 – 1.60	10 – 1.75	10 – 2.20	10 – 1.53	10 – 1.55
Reflections used in refinement (work/free)	41 316 / 2 086	34 856 / 1 730	15 498 / 749	46 953 / 2350	43 173 / 2275
Final R values for all reflections (work/free) [%]	20.7 / 24.7	21.1 / 25.6	20.3 / 31.2	19.6 / 24.9	21.7 / 27.1
Final R values for reflections with $F > 4 \sigma F$ (work/free) [%]	18.9 / 23.3	17.8 / 24.0	18.7 / 28.5	18.6 / 23.7	20.7 / 26.1
Protein residues	250	248	249	252	252
Sodium Ions	2	2	2	2	2
Inhibitor Atoms	27	30	28	45	47
Water molecules	157	104	116	208	157
RMSDs					
Bonds [Å]	0.009	0.007	0.006	0.010	0.010
Angles [°]	2.6	2.5	2.2	2.8	2.8
Ramachandran plot					
Residues in most favoured regions [%]	84.2	81.7	81.2	85.7	82.8
Residues in additional allowed regions [%]	15.4	17.8	18.8	13.9	16.7
Residues in generously allowed regions [%]	0.4	0.5	-	0.4	0.4
Mean B factor [Å²]					
Protein	21.4	31.0	20.2	21.6	21.2
Inhibitor	30.0	48.0	33.0	24.3	20.6
Water molecules	28.2	32.2	26.8	31.2	27.1

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden nach den üblichen Dreibuchstabencodes abgekürzt. Soweit nicht angegeben wurden SI-Einheiten und deren Ableitungen benutzt.

° C	Celsius (= $x + 273,15$ K)
Å	Ångström (= 10^{-10} m)
AS	Aminosäure
bar	Bar (= 10^5 Pa)
d	Tag(e) (= 86400 s)
Da	Dalton (= g/mol)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
Konf.	Konformation
L	Liter (= dm ³)
Lig	Ligand
M	Molarität (= kJ/mol)
MD	Molekulardynamik
min	Minute(n) (= 60 s)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
p. a.	<i>pro analysi</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PPACK	D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginin-chlormethylketon
PP _i	Pyrophosphat
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TRICIN	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Umdrehung

5.2 Kristallographische Begriffe

Auflösung Abstand d_{\min} der Gitterebenen in einem gegebenen Kristall gemäß der Braggschen Gleichung; $d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin \theta_{\max}}$, wobei θ_{\max} den Beugungswinkel darstellt, bis zu dem sich die Beugungsintensität maximal beobachten lässt.

Datensatz Ergebnis der Auswertung einer Serie von Diffraktionsbildern, welches die gemessenen Reflexe in Form von numerischen Werten der Reflexintensitäten bzw. Strukturfaktoramplituden ($|F_{hkl}|$) wiedergibt.

Differenz-Fourier Fouriersummation, bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden: die resultierende Elektronendichtekarte gibt die molekularen Unterschiede wieder, welche die Differenzen in den Strukturfaktoramplituden erzeugen.

F_{calc} Strukturfaktoren, die aus den Koordinaten eines Modells berechnet wurden, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $|F_{\text{calc}}|$ (kürzer F_c) und den Phasenwinkeln α_{calc} zusammensetzen.

F_{obs} Experimentelle Strukturfaktoren, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $|F_{\text{obs}}|$ (kürzer F_o) und falls experimentell bestimmt, den Phasenwinkeln α_{obs} zusammensetzen.

Multiplizität Mittelwert des Verhältnisses aus Anzahl der gemessenen Reflexe und der kristallographisch unabhängigen Reflexe.

R-Faktoren Werden in der Kristallographie dazu verwendet, um die Übereinstimmung von zwei Messwerten oder der Messwerte mit dem Modell zu beschreiben.

R, R_{cryst} Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur als Funktion der Übereinstimmung von $|F_{\text{calc}}|$ und $|F_{\text{obs}}|$;

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_o| - k|F_c||}{\sum_{hkl} |F_o|}$$

wobei k einen Skalierfaktor darstellt, um die gemessenen und die berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine einheitlich Skala zu bringen.

R_{free} Wird analog zu R mit einem bestimmten Anteil der Reflexe (*test set*) berechnet, die nicht bei der Verfeinerung berücksichtigt wurden, dies soll eine Überanpassung des Modells verhindern.

R_{sym} Beschreibung der Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung von symmetrieverwandten Reflexen;

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}}$$

für n unabhängige Reflexe und i Beobachtungen eines gegebenen Reflexes.

rigid body Bezeichnung für die Verfeinerung von ganzen Molekülen (oder Molekülteilen) als starre Körper.

rms bzw. RMS Quadratisches Mittel („*root mean square*“), das in der Regel zur Angabe von Abweichungen verwendet wird, im Gegensatz zum geometrischen Mittelwert werden hohe Differenzen stärker gewichtet.

simulated annealing Verfeinerungsalgorithmus in CNS, bei dem im Rahmen einer Moleküldynamikrechnung die Temperatur des Systems virtuell erhöht wird, um so den Konvergenzradius der Verfeinerung zu verbessern.

test set Teil der Strukturfaktoren eines Datensatzes, der nur zur Berechnung von R_{free} benutzt und nicht zur Verfeinerung herangezogen wird (in der Regel ca. 5-10% der Strukturfaktoramplituden).

Vollständigkeit Prozentualer Anteil der gemessenen unabhängigen Reflexe im Vergleich zur Anzahl der theoretisch möglichen Strukturfaktoren.

working set Strukturfaktoren, die nicht zum *test set* gehören und zur Verfeinerung benutzt werden (90-95% der Strukturfaktoramplituden).

Unabhängige Reflexe Anzahl der unabhängigen Reflexe bzw. Strukturfaktoramplituden, die nicht über eine kristallographische Symmetrie verknüpft sind.

5.3 Literaturverzeichnis

1. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology, 1929. **10**: p. 226-36.
2. Rosenberg, B., L. Vancamp, and T. Krigas, *Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*. Nature, 1965. **205**: p. 698-9.
3. Anderson, A.C., *The process of structure-based drug design*. Chem Biol, 2003. **10**(9): p. 787-97.
4. Kubinyi, H., *Chance favors the prepared mind--from serendipity to rational drug design*. J Recept Signal Transduct Res, 1999. **19**(1-4): p. 15-39.
5. Lombardino, J.G. and J.A. Lowe, 3rd, *The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(10): p. 853-62.
6. Klebe, G., *Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations*. Drug Discov Today, 2006. **11**(13-14): p. 580-94.
7. Blundell, T.L., H. Jhoti, and C. Abell, *High-throughput crystallography for lead discovery in drug design*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(1): p. 45-54.
8. Davis, A.M., S.J. Teague, and G.J. Kleywegt, *Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(24): p. 2718-36.
9. Betz, U.A., R. Farquhar, and K. Ziegelbauer, *Genomics: success or failure to deliver drug targets?* Curr Opin Chem Biol, 2005. **9**(4): p. 387-91.
10. Warren, G.L., et al., *A critical assessment of docking programs and scoring functions*. J Med Chem, 2006. **49**(20): p. 5912-31.
11. Lundqvist, T., *The devil is still in the details--driving early drug discovery forward with biophysical experimental methods*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2005. **8**(4): p. 513-9.
12. Andrews, P.R., D.J. Craik, and J.L. Martin, *Functional group contributions to drug-receptor interactions*. J Med Chem, 1984. **27**(12): p. 1648-57.
13. Lau, W.F. and B.M. Pettitt, *Selective elimination of interactions: a method for assessing thermodynamic contributions to ligand binding with application to rhinovirus antivirals*. J Med Chem, 1989. **32**(12): p. 2542-7.
14. Mark, A.E. and W.F. van Gunsteren, *Decomposition of the free energy of a system in terms of specific interactions. Implications for theoretical and experimental studies*. J Mol Biol, 1994. **240**(2): p. 167-76.
15. van Gunsteren, W.F., P.M. King, and A.E. Mark, *Fundamentals of drug design from a biophysical viewpoint*. Q Rev Biophys, 1994. **27**(4): p. 435-81.
16. Brady, G.P. and K.A. Sharp, *Entropy in protein folding and in protein-protein interactions*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(2): p. 215-21.
17. Jencks, W.P., *On the attribution and additivity of binding energies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4046-4050.

18. Ackers, G.K. and F.R. Smith, *Effects of site-specific amino acid modification on protein interactions and biological function*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 597-629.
19. Horovitz, A., *Non-additivity in protein-protein interactions*. J Mol Biol, 1987. **196**(3): p. 733-5.
20. Wells, J.A. and B.C. Cunningham, *Identification and design of binding determinants in proteins*. Biochem Soc Symp, 1990. **57**: p. 143-5.
21. Otzen, D.E. and A.R. Fersht, *Analysis of protein-protein interactions by mutagenesis: direct versus indirect effects*. Protein Eng, 1999. **12**(1): p. 41-5.
22. Ackers, G.K., et al., *Molecular code for cooperativity in hemoglobin*. Science, 1992. **255**(5040): p. 54-63.
23. Williams, D.H., Westwell, M.S., *Aspects of weak interactions*. Chemical Society Reviews, 1998. **27**: p. 57-3.
24. Williams, D.H., et al., *Understanding noncovalent interactions: ligand binding energy and catalytic efficiency from ligand-induced reductions in motion within receptors and enzymes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(48): p. 6596-616.
25. Hubbard, R.E., *Generating sets of thermodynamic and structural data for analysis of protein-ligand interactions*. Perspectives in Drug Discovery and Design, 2000. **20**: p. 29-42.
26. Tucker, T.J., et al., *Design and synthesis of a series of potent and orally bioavailable noncovalent thrombin inhibitors that utilize nonbasic groups in the P1 position*. J Med Chem, 1998. **41**(17): p. 3210-9.
27. Goldsack, N.R., et al., *Thrombin*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 1998. **30**(6): p. 641-6.
28. Stubbs, M.T., et al., *The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity*. Eur J Biochem, 1992. **206**(1): p. 187-95.
29. Berg, D.T., M.R. Wiley, and B.W. Grinnell, *Enhanced protein C activation and inhibition of fibrinogen cleavage by a thrombin modulator*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1389-91.
30. Böhm, H.-J., G. Klebe, and H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign der Weg zum Arzneimittel*. 1996, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. XXII, 599.
31. Dullweber, F., et al., *Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition*. J Mol Biol, 2001. **313**(3): p. 593-614.
32. Brandl, M., et al., *C-H...pi-interactions in proteins*. J Mol Biol, 2001. **307**(1): p. 357-77.
33. Tsuzuki, S., et al., *Origin of attraction and directionality of the pi/pi interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(1): p. 104-12.
34. McGaughey, G.B., M. Gagne, and A.K. Rappe, *pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15458-63.

35. Meyer, E.A., R.K. Castellano, and F. Diederich, *Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(11): p. 1210-50.
36. Mecozzi, S., A.P. West, Jr., and D.A. Dougherty, *Cation- π interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10566-71.
37. Williams, D.H., et al., *Understanding noncovalent interactions: ligand binding energy and catalytic efficiency from ligand-induced reductions in motion within receptors and enzymes*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2004. **43**(48): p. 6596-616.
38. Turnbull, W.B., B.L. Precious, and S.W. Homans, *Dissecting the cholera toxin-ganglioside GM1 interaction by isothermal titration calorimetry*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(4): p. 1047-54.
39. Bingham, R.J., et al., *Thermodynamics of binding of 2-methoxy-3-isopropylpyrazine and 2-methoxy-3-isobutylpyrazine to the major urinary protein*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(6): p. 1675-81.
40. Tanford, C., *The hydrophobic effect and the organization of living matter*. Science, 1978. **200**(4345): p. 1012-8.
41. Scheraga, H.A., G. Nemethy, and I.Z. Steinberg, *The contribution of hydrophobic bonds to the thermal stability of protein conformations*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 2506-8.
42. Frank, H.S.a.E., M:W:, J. Chem. Phys., 1945. **13**: p. 507 -532.
43. Chandler, D., *Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly*. Nature, 2005. **437**(7059): p. 640-7.
44. Ross, P.D. and S. Subramanian, *Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability*. Biochemistry, 1981. **20**(11): p. 3096-102.
45. Malham, R., et al., *Strong solute-solute dispersive interactions in a protein-ligand complex*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(48): p. 17061-7.
46. Barratt, E., et al., *Van der Waals interactions dominate ligand-protein association in a protein binding site occluded from solvent water*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(33): p. 11827-34.
47. Homans, S.W., *Water, water everywhere -- except where it matters?* Drug Discov Today, 2007. **12**(13-14): p. 534-9.
48. Young, T., et al., *Motifs for molecular recognition exploiting hydrophobic enclosure in protein-ligand binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 808-13.
49. Shimokhina, N., A. Bronowska, and S.W. Homans, *Contribution of ligand desolvation to binding thermodynamics in a ligand-protein interaction*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(38): p. 6374-6.
50. Dunitz, J.D., *Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions*. Chem Biol, 1995. **2**(11): p. 709-12.
51. Ford, D.M., *Enthalpy-entropy compensation is not a general feature of weak association*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(46): p. 16167-70.

52. Gilli, P., Ferretti, V., Gilli, G., Borea, P. A., *Enthalpy-Entropy Compensation in Drug-Receptor Binding*. J. Phys. Chem., 1994. **98**: p. 1515.
53. Westwell, M.S., et al., *Successful Predictions of the Residual Motion of Weakly Associated Species as a Function of the Bonding between Them*. J. Phys. Chem, 1996. **100**: p. 16000-16001.
54. Deinum, J., et al., *A thermodynamic characterization of the binding of thrombin inhibitors to human thrombin, combining biosensor technology, stopped-flow spectrophotometry, and microcalorimetry*. Anal Biochem, 2002. **300**(2): p. 152-62.
55. Holdgate, G.A., Fisher, S., Ward, W., *The Application of Isothermal Titration Calorimetry to Drug Discovery*, in *Biocalorimetry 2*, J.E. Ladbury, Doyle, M. L., Editor. 2004, Wiley: Chichester ; Hoboken, NJ. p. 59-79.
56. Ren, J., T.C. Jenkins, and J.B. Chaires, *Energetics of DNA intercalation reactions*. Biochemistry, 2000. **39**(29): p. 8439-47.
57. Henriques, D.A., J.E. Ladbury, and R.M. Jackson, *Comparison of binding energies of SrcSH2-phosphotyrosyl peptides with structure-based prediction using surface area based empirical parameterization*. Protein Sci, 2000. **9**(10): p. 1975-85.
58. Holdgate, G.A., *Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics*. Biotechniques, 2001. **31**(1): p. 164-6, 168, 170 passim.
59. Thomson, J.A., Ladbury, J. E., *Isothermal Titration Calorimetry: a Tutorial*, in *Biocalorimetry 2*, J.E. Ladbury, Doyle, M. L., Editor. 2004, Wiley: Chichester ; Hoboken, NJ. p. 37-58.
60. Wiseman, T., et al., *Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter*. Anal Biochem, 1989. **179**(1): p. 131-7.
61. McGovern, S.L., et al., *A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening*. J Med Chem, 2002. **45**(8): p. 1712-22.
62. McGovern, S.L., et al., *A specific mechanism of nonspecific inhibition*. J Med Chem, 2003. **46**(20): p. 4265-72.
63. O'Brien, R. and I. Haq, *Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics*, in *Biocalorimetry 2*, J.E. Ladbury, Doyle, M. L., Editor. 2004, Wiley: Chichester, Hoboken, NJ. p. 3-34.
64. Ruben, A.J., Y. Kiso, and E. Freire, *Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective*. Chem Biol Drug Des, 2006. **67**(1): p. 2-4.
65. Ohtaka, H., et al., *Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: the binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease*. Protein Sci, 2002. **11**(8): p. 1908-16.
66. Alban, S., *Antikoagulationen - Der steinige Weg zur Innovation*, in *Pharmazeutische Zeitung*. 2007. p. 14-23.
67. Stürzebecher, A., *Optimierung synthetischer Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa vom 4-Amidinobenzylamid-Typ*. 2005.
68. Triplett, D.A., *Coagulation and bleeding disorders: review and update*. Clin Chem, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1260-9.

69. Geiger, J., et al., *Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(8): p. 2007-11.
70. King, D.M.W., <http://themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.html>.
71. Hauptmann, J. and J. Sturzebecher, *Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside*. *Thromb Res*, 1999. **93**(5): p. 203-41.
72. Bode, W., et al., *The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment*. *Embo J*, 1989. **8**(11): p. 3467-75.
73. Stubbs, M.T. and W. Bode, *A model for the specificity of fibrinogen cleavage by thrombin*. *Semin Thromb Hemost*, 1993. **19**(4): p. 344-51.
74. Steinmetzer, T. and J. Sturzebecher, *Progress in the development of synthetic thrombin inhibitors as new orally active anticoagulants*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(17): p. 2297-321.
75. Maraganore, J.M., et al., *Anticoagulant activity of synthetic hirudin peptides*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(15): p. 8692-8.
76. Okamoto, S., et al., *Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981. **101**(2): p. 440-6.
77. Ho, S.J. and T.A. Brighton, *Ximelagatran: direct thrombin inhibitor*. *Vasc Health Risk Manag*, 2006. **2**(1): p. 49-58.
78. Gustafsson, D., *Discovery of ximelagatran in an historical perspective*. *Semin Vasc Med*, 2005. **5**(3): p. 227-34.
79. Gustafsson, D. and M. Elg, *The pharmacodynamics and pharmacokinetics of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran and its active metabolite melagatran: a mini-review*. *Thromb Res*, 2003. **109 Suppl 1**: p. S9-15.
80. Fiessinger, J.N., et al., *Ximelagatran vs low-molecular-weight heparin and warfarin for the treatment of deep vein thrombosis: a randomized trial*. *Jama*, 2005. **293**(6): p. 681-9.
81. Hellwig, B., *Dabigatran - Oraler Thrombinhemmer zur Thromboseprophylaxe nach Operationen*, in *DAZ - Neue Arzneimittel*. 2008.
82. Padmanabhan, K., et al., *Structure of human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution*. *J Mol Biol*, 1993. **232**(3): p. 947-66.
83. Brandstetter, H., et al., *X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(47): p. 29988-92.
84. Gerlach, C., et al., *Thermodynamic Inhibition Profile of a Cyclopentyl and a Cyclohexyl Derivative towards Thrombin: The Same but for Different Reasons*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007. **46**(44): p. 8511-8514.

85. Brandt, T., *Kalorimetrische und strukturelle Untersuchung von Protein-Ligand Wechselwirkungen am Beispiel der Serinproteasen Thrombin und Trypsin*. Diplomarbeit, 2008.
86. Gilli, P.F., V.; Gilli, G., *Enthalpy- Entropy Compensation in Drug-Receptor Binding*. J. Phys. Chem, 1994. **98**: p. 1515-1518.
87. Danilewicz, J.C., et al., *Design of selective thrombin inhibitors based on the (R)-Phe-Pro-Arg sequence*. J Med Chem, 2002. **45**(12): p. 2432-53.
88. Ambler, J., et al., *The discovery of orally available thrombin inhibitors: optimisation of the P1 pharmacophore*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(8): p. 1103-8.
89. Lumma, W.C., Jr., et al., *Design of novel, potent, noncovalent inhibitors of thrombin with nonbasic P-1 substructures: rapid structure-activity studies by solid-phase synthesis*. J Med Chem, 1998. **41**(7): p. 1011-3.
90. Rittle, K.E., et al., *Unexpected enhancement of thrombin inhibitor potency with o-aminoalkylbenzylamides in the P1 position*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(20): p. 3477-82.
91. Young, M.B., et al., *Discovery and evaluation of potent P1 aryl heterocycle-based thrombin inhibitors*. J Med Chem, 2004. **47**(12): p. 2995-3008.
92. Chan, C., et al., *Factor Xa inhibitors: S1 binding interactions of a series of N-[(3S)-1-[(1S)-1-methyl-2-morpholin-4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin-3-yl]sulfonamides*. J Med Chem, 2007. **50**(7): p. 1546-57.
93. Maignan, S., et al., *Molecular structures of human factor Xa complexed with ketopiperazine inhibitors: preference for a neutral group in the S1 pocket*. J Med Chem, 2003. **46**(5): p. 685-90.
94. Choi-Sledeski, Y.M., et al., *Discovery of an orally efficacious inhibitor of coagulation factor Xa which incorporates a neutral P1 ligand*. J Med Chem, 2003. **46**(5): p. 681-4.
95. Pinto, D.J., et al., *Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa*. J Med Chem, 2007. **50**(22): p. 5339-56.
96. Roehrig, S., et al., *Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-[(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl]methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor*. J Med Chem, 2005. **48**(19): p. 5900-8.
97. Imai, Y.N., et al., *Cl-pi interactions in protein-ligand complexes*. Protein Sci, 2008. **17**(7): p. 1129-37.
98. Sivaraman, S., et al., *Inhibition of the bacterial enoyl reductase FabI by triclosan: a structure-reactivity analysis of FabI inhibition by triclosan analogues*. J Med Chem, 2004. **47**(3): p. 509-18.
99. Tonge, P.J., C. Kisker, and R.A. Slayden, *Development of modern InhA inhibitors to combat drug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis*. Curr Top Med Chem, 2007. **7**(5): p. 489-98.

100. Sullivan, T.J., et al., *High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis*. ACS Chem Biol, 2006. **1**(1): p. 43-53.
101. Sivaraman, S., et al., *Structure-activity studies of the inhibition of FabI, the enoyl reductase from Escherichia coli, by triclosan: kinetic analysis of mutant FabIs*. Biochemistry, 2003. **42**(15): p. 4406-13.
102. Gohlke, H. and G. Klebe, *Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(15): p. 2644-76.
103. Whitesides, G.M. and V.M. Krishnamurthy, *Designing ligands to bind proteins*. Q Rev Biophys, 2005. **38**(4): p. 385-95.
104. Talhout, R., et al., *Understanding binding affinity: a combined isothermal titration calorimetry/molecular dynamics study of the binding of a series of hydrophobically modified benzamidine chloride inhibitors to trypsin*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(35): p. 10570-9.
105. Barratt, E., et al., *Thermodynamic penalty arising from burial of a ligand polar group within a hydrophobic pocket of a protein receptor*. J Mol Biol, 2006. **362**(5): p. 994-1003.
106. Krishnamurthy, V.M., et al., *The paradoxical thermodynamic basis for the interaction of ethylene glycol, glycine, and sarcosine chains with bovine carbonic anhydrase II: an unexpected manifestation of enthalpy/entropy compensation*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(17): p. 5802-12.
107. Mlinsek, G., et al., *Thrombin inhibitors with novel P1 binding pocket functionality: free energy of binding analysis*. J Mol Model, 2007. **13**(1): p. 247-54.
108. Bode, W., *The structure of thrombin, a chameleon-like proteinase*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(11): p. 2379-88.
109. Gerlach, C., et al., *KNOBLE: a knowledge-based approach for the design and synthesis of readily accessible small-molecule chemical probes to test protein binding*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(47): p. 9105-9.
110. Swierczynski, D., et al., *Non-Covalent Interactions of Organic Halogen Compounds with Aromatic Systems - Analyses of Crystal Structure Data*. Eur J Org Chem, 2005: p. 1172-77.
111. Petrova, T., et al., *Factorizing selectivity determinants of inhibitor binding toward aldose and aldehyde reductases: structural and thermodynamic properties of the aldose reductase mutant Leu300Pro-fidarestat complex*. J Med Chem, 2005. **48**(18): p. 5659-65.
112. Valvani, S.C., S.H. Yalkowsky, and T.J. Roseman, *Solubility and partitioning IV: Aqueous solubility and octanol-water partition coefficients of liquid nonelectrolytes*. J Pharm Sci, 1981. **70**(5): p. 502-7.
113. Yalkowsky, S.H. and S.C. Valvani, *Solubility and partitioning I: Solubility of nonelectrolytes in water*. J Pharm Sci, 1980. **69**(8): p. 912-22.

114. Bodor, N. and M.J. Huang, *A new method for the estimation of the aqueous solubility of organic compounds*. J Pharm Sci, 1992. **81**(9): p. 954-60.
115. Freindorf, M., *Protein Ligand Binding Affinity: A Detailed Investigation Into the Surprising Potency provided by a Meta-Chlorobenzyl Side Chain in the Thrombin S1 Pocket*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **submitted**.
116. Gallivan, J.P. and D.A. Dougherty, *Cation- π interactions in structural biology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9459-64.
117. Chang, C.E., W. Chen, and M.K. Gilson, *Ligand configurational entropy and protein binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1534-9.
118. Menear, K., *Direct thrombin inhibitors: current status and future prospects*. Expert Opin Investig Drugs, 1999. **8**(9): p. 1373-84.
119. Meyer, E.E., K.J. Rosenberg, and J. Israelachvili, *Recent progress in understanding hydrophobic interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15739-46.
120. Tucker, T.J., et al., *Design of highly potent noncovalent thrombin inhibitors that utilize a novel lipophilic binding pocket in the thrombin active site*. J Med Chem, 1997. **40**(6): p. 830-2.
121. Tucker, T.J., et al., *Synthesis of a series of potent and orally bioavailable thrombin inhibitors that utilize 3,3-disubstituted propionic acid derivatives in the P3 position*. J Med Chem, 1997. **40**(22): p. 3687-93.
122. Tucker, T.J., et al., *Potent noncovalent thrombin inhibitors that utilize the unique amino acid D-dicyclohexylalanine in the P3 position. Implications on oral bioavailability and antithrombotic efficacy*. J Med Chem, 1997. **40**(11): p. 1565-9.
123. Nilsson, M., et al., *Compounds Binding to the S2-S3 Pockets of Thrombin*. J Med Chem, 2009.
124. Baum B., M.M., Zayed M., Gerlach C, Heine, A., Hangauer, D. and Klebe, G., *More than a simple lipophilic contact: A detailed thermodynamic analysis of nonbasic residues in the S1-pocket of Thrombin*. J. Mol. Biol., 2009: p. submitted.
125. Hendlich, M., et al., *Relibase: design and development of a database for comprehensive analysis of protein-ligand interactions*. J Mol Biol, 2003. **326**(2): p. 607-20.
126. Czodrowski, P., C.A. Sotriffer, and G. Klebe, *Protonation changes upon ligand binding to trypsin and thrombin: structural interpretation based on $pK(a)$ calculations and ITC experiments*. J Mol Biol, 2007. **367**(5): p. 1347-56.
127. LSBU, <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/ph.html>.
128. Williams, D.H., et al., *Toward an estimation of binding constants in aqueous solution: studies of associations of vancomycin group antibiotics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(4): p. 1172-8.
129. Vallone, B., et al., *Free energy of burying hydrophobic residues in the interface between protein subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6103-7.
130. Steuber, H., et al., *Tracing changes in protonation: a prerequisite to factorize thermodynamic data of inhibitor binding to aldose reductase*. J Mol Biol, 2007. **373**(5): p. 1305-20.

131. Bas, D.C., D.M. Rogers, and J.H. Jensen, *Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes*. Proteins, 2008. **73**(3): p. 765-83.
132. Czodrowski, P., et al., *Development, validation, and application of adapted PEOE charges to estimate pKa values of functional groups in protein-ligand complexes*. Proteins, 2006. **65**(2): p. 424-37.
133. Stauffer, K.J., et al., *9-hydroxyazafluorenes and their use in thrombin inhibitors*. J Med Chem, 2005. **48**(7): p. 2282-93.
134. Vlasuk, G.P., *Structural and functional characterization of tick anticoagulant peptide (TAP): a potent and selective inhibitor of blood coagulation factor Xa*. Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 212-6.
135. Schweinitz, A., et al., *New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1*. Med Chem, 2006. **2**(4): p. 349-61.
136. Steinmetzer, T., *Beiträge zur Entwicklung synthetischer Thrombinhemmstoffe als potentielle Antikoagulantien*. Habilitationsschrift, 2003: p. 129.
137. Fokkens, J. and G. Klebe, *A simple protocol to estimate differences in protein binding affinity for enantiomers without prior resolution of racemates*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(6): p. 985-9.
138. Sigurskjold, B.W., *Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry*. Anal Biochem, 2000. **277**(2): p. 260-6.
139. Wang, Z.X., *An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule*. FEBS Lett, 1995. **360**(2): p. 111-4.
140. Fokkens, J., *Mikrokalorimetrische Studien zum Verständnis der thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften von Inhibitoren der Blutgerinnungskaskade*. 2005.
141. Lundbäck, T., *In The Mix: Simultaneous Affinity Determination for Isomers and Enantiomers*. Microcal Application Note, 2007.
142. Sturzebecher, J., et al., *Synthetic inhibitors of bovine factor Xa and thrombin comparison of their anticoagulant efficiency*. Thromb Res, 1989. **54**(3): p. 245-52.
143. Dixon, M., *The graphical determination of K_m and K_i*. Biochem J, 1972. **129**(1): p. 197-202.
144. Otwinowski, Z., Minor, W., *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. Meth. Enzym., 1997. **276**: p. 307-326.
145. Skordalakes, E., et al., *Inhibition of human alpha-thrombin by a phosphonate tripeptide proceeds via a metastable pentacoordinated phosphorus intermediate*. J Mol Biol, 2001. **311**(3): p. 549-55.
146. Brunger, A.T., et al., *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1998. **54**(Pt 5): p. 905-21.
147. Sheldrick, G.M., Schneider, T. R., *SHELXL: High-resolution refinement*. Macromolecular Crystallography, Pt B, 1997. **277**: p. 319-43.

148. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
149. Laskowski, R.A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J. Appl. Cryst., 1993. **26**: p. 283-291.
150. Kleywegt, G.J., Zou, J. Y., Kjeldgaard, M., Jones, T. A., *Around O*, in *International Tables for Crystallography, Vol. F. Crystallography of Biological Macromolecules*, M.G. Rossmann, Arnold, E., Editor. 2001, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. p. 353-356, 366-367.
151. Sheriff, S., W.A. Hendrickson, and J.L. Smith, *Structure of myohemerythrin in the azidomet state at 1.7/1.3 Å resolution*. J Mol Biol, 1987. **197**(2): p. 273-96.
152. Sheriff, S., Immunomethods, 1993(3): p. 191-196.

5.4 Lebenslauf

Bernhard Baum, geboren am 21.09.1978 in Hameln



Schulbildung

1985 – 1991 Katholische Grundschule und Orientierungsstufe Nord in Hameln

1991 – 1998 Albert-Einstein-Gymnasium in Hameln, Abschluß mit dem Abitur

Zivildienst

1998 – 1999 Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung eines Kindes für den Paritätischen Wohlfahrtsverband in Hameln

Studium

1999 – 2003 Pharmaziestudium an der Philipps-Universität in Marburg
und an der University of Kuopio / Finnland

2000 Famulatur in der Apotheke des Marburger Universitätsklinikums und in der Hamelner Apotheke im Sintermann

Beruflicher Werdegang

2003 - 2004 Pharmaziepraktikum in der Nordringapotheke, Berlin
und im ev. Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge, Berlin

2004 Approbation als Apotheker

Jan. – Jul. 2005 Anstellung in der Apotheke an der Post Neukölln, Berlin

Seit Sept. 2005 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität in Marburg, Promotion im Arbeitskreis von Prof. Gerhard Klebe,
Betreuung von Seminaren und Studentenpraktika zur Arzneibuchanalytik

5.5 Danksagung

Diese Dissertation konnte nur mit Hilfe vieler Menschen entstehen, die mich auf dem dreieinhalbjährigen Weg fachlich und freundschaftlich begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Professor Gerhard Klebe für die interessante Aufgabenstellung, für die Unterstützung bei der Interpretation der Daten, für die Möglichkeit an internationalen Konferenzen teilzunehmen, für das viele konstruktive Korrekturlesen und für die gewährten Freiheiten während der Dissertation.

Professor Dave Hangauer and his PhD-students at Buffalo, especially *Laveena Muley*, for having the idea of targeting thrombin the way we did, for the synthesis of almost hundred compounds, for hosting me at their department and for taking me out to the falls.

Dr. Andreas Heine für die Einführung in die Geheimnisse der Röntgenkristallographie, für seine kompetente und geduldige Unterstützung bei allen gelösten Proteinstrukturen und für das aufmerksame Korrekturlesen.

Dr. Christof Gerlach und *Dr. Holger Steuber* für die freundliche Einarbeitung in das weite Feld der Serinproteasen und in die praktische Durchführung der Mikrokalorimetrie.

Professor Torsten Steinmetzer und *Professor Jörg Stürzebecher*, von deren immer wieder beeindruckend großem Erfahrungsschatz im Bereich der Proteasehemmstoffe ich sehr profitiert habe.

Dem Diplom-Chemiker *Tobias Brandt* für die angenehme Atmosphäre während seiner Diplomarbeit, für die gute Zusammenarbeit und für die Entlastung durch die Übernahme der Trypsin-Kristallisation.

Dr. Christian Sohn für die viele Hilfe beim Pipettieren, für die Einführung ins Brückensprengen und für die Heiligsprechung des Feierabends.

Den Vertiefungsstudenten *Rosemarie Lazar* und *Nico Mell* für die fleißige Übernahme von Relibase-Recherchen und ITC-Titrationen mit Racematen.

Prof. Bent Sigurskjöld für die schnelle Programmierung des *SimulDisplace*-Modells in die Origin-Software.

Sven Siebler und *Gerd Neudert* für die zeitaufwendige Betreuung des Arbeitskreisnetzwerkes und die häufige und kompetente Hilfe bei allem was Computer betrifft.

Der gesamten *AG Klebe* für die entspannte Arbeitsatmosphäre, für den Spaß beim Skifahren und die vielen Um-15-Uhr-gibt's-Kuchen-Mails.

Dem Team von DESY in Haburg und BESSY in Berlin für die Hilfe beim Sammeln hochaufgelöster Datensätze durch Synchrotronstrahlung und dem BMBF (support code 05ES3XBA/5) für die Übernahme der Reisekosten zum BESSY/Berlin.

Der Firma CSL Behring (Marburg) für die Versorgung mit humanem Thrombin in großzügigen Mengen.

Der Firma Merck in Darmstadt für die Auftrennung der Racemate einiger Thrombininhibitoren.

Matthias Hahl for being Matthias Hahl.

Lisa Englert und *Daniel Schulze*, ohne die es nicht gegangen wäre.

Hendrik Spillecke, *Matthias Wulff*, *Inken Heldt*, *Jan Gail*, *Herdes Teich*, *Ulla Keller*. Ihr wart das nichtpharmazeutische Marburg und damit von unschätzbarem Wert.

Anna Flügel, *Jesko Jockenhövel*, *Bea Dittmann* und *Alex Jonas* for being Berlin.

Katrin Göken, *Roland Baum*, *Arne Zahl* und *Julia Marre*.

Simon Heuking und *Kristin Löber* für den Mut im Ausland zu promovieren, der mir gelegentliches spontanes Stillen von Fernweh ermöglicht hat.

Dr. Bernhard Dieckmann dafür, dass aus Nachbarschaft Freundschaft wurde.

5.6 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

The well-tempered Thrombin

A systematic crystallographic and calorimetric study on the thermodynamics of serine-protease inhibition

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich gekennzeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zunahme)